



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización funcional de TcCAL1, una nueva proteína con dominios de unión a calcio identificada en *Trypanosoma cruzi*

*Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas*

Lic. Jessica Jenireth Rodríguez Durán

Directora de tesis: Dra. Mariana Potenza

Consejero de estudios: Dr. Guillermo Alonso

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología e Inmunología de las Infecciones por Tripanosomátidos. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)

Buenos Aires, 2024

Caracterización funcional de TcCAL1, una nueva proteína con dominios de unión a calcio identificada en *Trypanosoma cruzi*

Resumen

En *T. cruzi*, el ion calcio (Ca^{2+}) juega un papel fundamental en los procesos de metaciclologénesis y en la invasión a la célula hospedadora. TcCAL1 es una proteína de 103 aminoácidos, sin función conocida y exclusiva de kinetoplastos cuya secuencia contiene dos motivos de unión a Ca^{2+} del tipo *EF-hand*. Nos planteamos como hipótesis que TcCAL1 podría actuar como un sensor de los niveles de Ca^{2+} intracelular *T. cruzi*, modulando la función de las proteínas con las cuales se asocia. Para probar la hipótesis, se caracterizó funcionalmente a TcCAL1 y se determinó su importancia en el ciclo de vida de *T. cruzi*. Mediante análisis por RMN, dicroísmo circular y ensayos de fluorescencia utilizando el indicador de calcio Quin-2, se estudió la capacidad de unión a Ca^{2+} de la proteína TcCAL1 recombinante (TcCAL1x6His). Mediante microscopía de inmunofluorescencia, se determinó que TcCAL1 se localiza en todo el cuerpo celular de amastigotes, tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes. Se obtuvieron cultivos que sobreexpresan TcCAL1x6His y se estudió el fenotipo en varios procesos del ciclo de vida del parásito. Se demostró que la sobreexpresión de TcCAL1x6His inhibe la metaciclologénesis y provoca un aumento significativo tanto en los índices de adhesión como en los índices de infección de tripomastigotes metacíclicos a células Vero. Asimismo, se encontró que los niveles expresión de TcCAL1 endógena son significativamente mayores en tripomastigotes respecto a amastigotes axénicos o epimastigotes. No se observaron diferencias en la fase exponencial de proliferación de epimastigotes o en la amastigogénesis *in vitro* cuando se compararon los parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His con los controles. Se obtuvieron parásitos que presentan una disminución de la expresión de TcCAL1 (*hemi-knockout*) mediante el sistema CRISPR/CAS9, que no mostraron diferencias significativas en la proliferación se compararon con los controles. También, se determinaron los niveles intracelulares de Ca^{2+} intracelular en los parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His cuando se compararon con los cultivos control. Finalmente, se identificaron dos proteínas que interaccionan con TcCAL1, anotadas en el genoma de *T. cruzi* como proteínas sin caracterizar. La función de estas proteínas y la relación con TcCAL1 en su rol como posible factor de virulencia son aspectos interesantes que se derivan de este trabajo y que promueven nuevas investigaciones.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, invasión, calcio intracelular, metaciclologénesis.

Functional characterization of TcCAL1, a novel protein with calcium binding domains identified in *Trypanosoma cruzi*

Abstract

In *T. cruzi*, the calcium ion (Ca^{2+}) plays a fundamental role in the processes of metacyclogenesis and host cell invasion. TcCAL1 is a 103-amino acid protein, with unknown function, exclusive to kinetoplastids, and has two EF-hand-type Ca^{2+} binding motifs in its sequence. We hypothesized that TcCAL1 might function as an intracellular Ca^{2+} sensor in *T. cruzi*, thereby modulating the activity of the proteins with which it interacts. To test this hypothesis, we functionally characterized TcCAL1 and determined its importance in the life cycle of *T. cruzi*. Using NMR analysis, circular dichroism, and fluorescence assays with the calcium indicator Quin-2, we studied the Ca^{2+} binding capacity of recombinant TcCAL1 protein (TcCAL1x6His). We found that TcCAL1 is located throughout the cellular body of amastigotes, metacyclic trypomastigotes, and epimastigotes by immunofluorescence microscopy. We obtained transgenic cultures overexpressing TcCAL1x6His and studied their phenotype in various stages of the parasite's life cycle. Results showed that the overexpression of TcCAL1x6His inhibits metacyclogenesis and significantly increases both adhesion rates and infection rates of metacyclic trypomastigotes to Vero cells. Additionally, we found that endogenous TcCAL1 expression levels are significantly higher in trypomastigotes compared to axenic amastigotes or epimastigotes. No differences were observed in the proliferation of epimastigotes or in vitro amastigogenesis parasites overexpressing TcCAL1x6His compared with *wild type* counterparts. We generated parasites with reduced TcCAL1 expression (*hemi-knockout*) using the CRISPR/CAS9 system. These parasites showed no significant differences in proliferation or metacyclogenesis compared to controls. Intracellular calcium levels were also determined in parasites overexpressing TcCAL1x6His and compared to control cultures. Finally, two proteins that interact with TcCAL1 were identified through yeast two-hybrid assays, both annotated as uncharacterized proteins in the *T. cruzi* genome. The function of these proteins and their relationship with TcCAL1 in its potential role as a virulence factor are intriguing aspects that arise from this work and promote further research.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, host-cell invasion, intracellular calcium, metacyclogenesis.

Agradecimientos

Al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires por la oportunidad que me dieron para formarme en la ciencia y cumplir una nueva meta.

A la Dra. Mariana Potenza, por la oportunidad y la confianza. Por su orientación y su calidad humana. Su compromiso, su manera amigable y respetuosa de guiarme fue vital para llevar adelante esta tesis.

A la Dra. Karina Gómez, por abrírnos las puertas de su laboratorio, su pasión, su conocimiento y entrega con el trabajo fue esencial en la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Mica, Juan Pablo, Fati y Karen. Por escuchar cada parte de esta tesis con atención y siempre estar dispuestos a ayudar.

Al laboratorio 211 y a las maravillosas personas que hacen e hicieron vida allí: Marti, Juan Pablo, Iara, Noe, Marina y Juani. Por las risas, los cafés, la música, los mates, el cariño y la buena onda. Hicieron leve y divertido cada día de trabajo en la mesada.

A mi amigo Arturo, por el apoyo, las charlas de la vida y por todos estos años de amistad que dieron para llorar y reír un doctorado.

A mis compis Ro y Ceci, por compartir el delirio de estudiar estos increíbles organismos. Por el cariño y las charlas filosóficas en el cuarto de cultivo.

Al Dr. Guillermo Alonso, por los consejos que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Juan Goutman, a la Dra. Gabriela Gómez y a la Dra. Natalia Fernández, por su gentileza y disposición a contribuir con el avance de este trabajo.

A la Dra. María Teresa Téllez, la Tere, por su cariño y recibimiento desde el primer momento que entré al laboratorio.

Al Dr. Gustavo Benaim, por compartir generosamente su conocimiento y aportar puntos de vista valiosos a este trabajo.

A los compañeros del INGEBI, Alejo, Salo, Ale, Cata, Ceci, Iván, Edgar, Nacho, Alberto, Coti, Fran, Javi, Santi y Gonza, por la buena onda de siempre.

A Rubén, Adrián y Norma, gracias por la buena disposición y el inmenso trabajo que hacen en el instituto.

A mi familia en Buenos Aires, Rafa, José Daniel, Anilo, Javier, Gaby, Daniel Johnma, Samuel, Michel y Gonza, por su amistad y por hacer que la casa siempre se sintiera cerca.

A mi amigo Yorfer, por estar desde temprano en mi camino en la ciencia, por su amistad y su apoyo incondicional.

A Laurita por las charlas interminables, el cariño y la compañía en las aventuras en este hermoso país.

A Katty Mora, por 20 años de amistad en los que ha sido un gran apoyo, estando siempre en primera fila en los momentos buenos y en los difíciles.

A mis queridos amigos de los caminos de la vida: Jesús, Junior, Andreina, Whendy, Kharelys, Rita, Rebeca, Mauricio, Rosario, Albania, Emiliana y Gustavo, por estar siempre cerca, por el cariño sincero y desmedido que me brindan aún en la distancia.

A mis primos Cristthian, Jibelly, Kenya y Keyth por brindarme tanto cariño siempre y por estar sin importar las circunstancias.

A mi mamá y mi papá, porque me enseñaron el camino de la responsabilidad, la disciplina y el trabajo, por su amor y apoyo en cada uno de mis pasos.

A mis hermanas, Bri y Lili, por ser inspiración y ejemplo de fortaleza.

A mi hermanito Marcos, por demostrarme que con paciencia y constancia siempre se puede terminar una carrera.

A mis sobrinas Amelie, Lía, Amaia y Dai, por hacerme sentir el amor de tía y alegrarme los días.

A la hermosa Argentina, por sus lugares, su gente y por ser mi hogar durante estos 6 años

A todas las personas que en algún momento fueron abrazo, apoyo y compañía en este camino.

¡Gracias!

*Mira el jilguero. No es nada:
Miedo y plumas.
Sin embargo, escondido entre las ramas,
puede hacer que cante un árbol.*

José Mateos

Índice

Resumen	2
Abstract.....	3
Agradecimientos	4
1. Introducción	12
1.1 La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana	13
1.2 Manifestaciones clínicas y tratamiento de la Enfermedad de Chagas	14
1.3 Clasificación y diversidad genética de <i>T. cruzi</i>	15
1.4 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	15
1.5 Características celulares, bioquímicas y genómicas de <i>T. cruzi</i>	17
1.6 Procesos regulados por Ca^{2+} en el ciclo de vida en <i>T. cruzi</i>	19
1.7 Homeostasis del Ca^{2+} en <i>T. cruzi</i>	24
1.8 Antecedentes.....	27
1.8.1 TcCAL1 en <i>T. cruzi</i>	27
1.9 Hipótesis de trabajo	29
1.10 Objetivos.....	29
2. Materiales y métodos.....	31
2.1 Reactivos	32
2.1.1 Soluciones.....	32
2.1.2 Anticuerpos.....	32
2.2 Medios de cultivo	33
2.3 Oligonucleótidos.....	34
2.4 Vectores.....	36
2.5. Material biológico y cultivos celulares <i>in vitro</i>	36
2.5.1 Bacterias.....	36
2.5.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
2.5.3 Células Vero	37
2.5.4 Levaduras.....	37
2.6 Análisis <i>in silico</i> de la proteína TcCAL1	38
2.6.1 Análisis filogenético	38
2.6.2 Predicción de estructura tridimensional y unión a Ca^{2+} por TcCAL1	38

2.6.3 Estudio de dominios de unión a Ca^{2+} <i>EF-hand</i>	39
2.6.4 Predicción de modificaciones postraduccionales	39
2.7 Técnicas generales de ingeniería genética	39
2.7.1 Extracción de DNA genómico de <i>T. cruzi</i>	39
2.7.2 Amplificación de secuencias codificantes por reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	39
2.7.3 Purificación de ácidos nucleicos.....	39
2.7.4 Reacciones de digestión y ligación de ácidos nucleicos	40
2.7.5 Análisis de colonias recombinantes por <i>colony-PCR</i>	41
2.7.6 Electroforesis en geles de agarosa.....	42
2.7.7 Cuantificación de ácidos nucleicos	42
2.7.8 Secuenciación de ácidos nucleicos	42
2.8 Generación de cultivos transgénicos	42
2.8.1 Transformación y selección bacteriana	42
2.8.2 Generación de líneas transgénicas de parásitos.....	43
2.8.3 Transformación de levaduras	46
2.8.3.2.....	46
2.9 Ensayo de doble híbrido.....	47
2.9.1 Sistema de doble híbrido en Levaduras	47
2.9.2 Vectores de expresión de levaduras utilizados.....	48
2.9.3 Clonado de <i>tccal1</i> en el vector pBTM116	48
2.9.4 Control de autoactivación y tratamiento con 3-Amino-1,2,4-Triazol	48
2.9.5 Transformación y selección de clones positivos	49
2.9.6 Medición de actividad β -galactosidasa	49
2.9.7 Obtención de secuencias de clones positivos.....	50
2.9.8 Control de interacción específica	50
2.10 Técnicas de obtención, análisis y procesamiento de proteínas	50
2.10.1 Obtención de extractos de proteínas.....	50
2.11 Cuantificación de proteínas	52
2.12 Electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida (<i>SDS-PAGE</i>)	52
2.13 <i>Western blot</i>	52
2.14 Producción de TcCAL1x6His recombinante	53
2.14.1 Inducción de la expresión de TcCAL1x6His a partir de bacterias.....	53
2.14.2 Purificación de TcCAL1x6His a partir de bacterias	53

2.15 Tratamiento reductor con β -mercaptoetanol.....	54
2.16 Tratamiento con resina Chelex® 100.....	54
2.17 Concentración de la proteína TcCAL1x6His	54
2.18 Producción de suero policlonal anti-TcCAL1x6His	54
2.19 Técnicas analíticas de proteínas	55
2.19.1 Determinación de unión a Ca^{2+} por TcCAL1x6His.....	55
2.19.2 Dicroísmo circular (CD).....	55
2.19.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)	55
2.19.4 Ensayo de unión de Ca^{2+} con el indicador Quin-2	56
2.20 Análisis de modificaciones postraduccionales	56
2.20.1 Ensayo de palmitoilación de TcCAL1x6His: Intercambio acil-biotina (AB) ...	56
2.21 Determinación de niveles de Ca^{2+} intracelular en epimastigotes	57
2.22 Ensayos biológicos <i>in vitro</i>	58
2.22.1 Localización subcelular por inmunofluorescencia	58
2.22.2 Curva de proliferación de epimastigotes.....	59
2.22.3 Metaciclologénesis <i>in vitro</i> de epimastigotes	59
2.22.4 Aislamiento de tripomastigotes metacíclicos.....	60
2.22.5 Amastigogénesis <i>in vitro</i> a partir de tripomastigotes metacíclicos.....	60
2.22.6 Adhesión de tripomastigotes metacíclicos a células Vero	61
2.22.7 Invasión <i>in vitro</i> de tripomastigotes metacíclicos a células Vero	61
2.23 Infección <i>in vivo</i> de ratones con tripomastigotes metacíclicos	62
2.24 Análisis estadístico.....	63
3. Resultados	64
PARTE I. Estudios <i>in silico</i> de las características de TcCAL1 de <i>T. cruzi</i>	65
3.1 Relaciones filogenéticas de TcCAL1, características de la secuencia aminoacídica y modelado estructural	65
3.2 Análisis de los dominios <i>EF-hand</i> de TcCAL1.....	67
3.3 Predicción de sitios de unión a Ca^{2+} y análisis estructural.....	69
3.4 Predicción de modificaciones post-traduccionales: Palmitoilación	71
PARTE II. Rol de TcCAL1 en la modulación de Ca^{2+} intracelular y en el ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	72

3.5 Obtención de antisuero policlonal anti-TcCAL1x6His.....	72
3.6 Expresión y localización subcelular de TcCAL1 en <i>T. cruzi</i>	73
3.7 Silenciamiento del gen <i>tcca1</i> mediante CRISPR/CAS9.....	75
3.8 Sobreexpresión de TcCAL1 en <i>T. cruzi</i>	80
3.9 Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de TcCAL1 en la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	82
3.10 Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de <i>tcca1</i> en procesos de diferenciación de <i>T. cruzi</i>	84
3.11 Efecto de la sobreexpresión de TcCAL1x6His en la invasión a células de mamífero	87
3.12 Determinación de niveles de calcio en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> que sobreexpresan TcCAL16xHis.....	89
PARTE III. Bioquímica y entorno molecular de TcCAL1 de <i>T. cruzi</i>	92
3.13 Expresión de la proteína TcCAL1 recombinante y producción de anticuerpo policlonal	92
3.14 Purificación de TcCAL1x6His con columna Ni-NTA.....	92
3.15 Determinación de unión a Ca^{2+} por TcCAL1	93
<i>Ensayos con el indicador Quin-2</i>	93
<i>Tratamiento de TcCAL1x6His con β-mercaptoetanol</i>	94
<i>Determinación de unión a Ca^{2+} a través de dicroísmo circular (DC)</i>	95
<i>Ensayos de Resonancia magnética nuclear (RMN)</i>	98
3.16 Estudio de modificación por palmitoilación de TcCAL1	101
.....	102
3.17 Identificación de proteínas de unión a TcCAL1 en ensayo de doble híbrido en levaduras.....	102
<i>Obtención de levaduras pBTM116/TcCAL1 y ensayos de autoactivación</i>	102
<i>Transformación de levaduras L40 TcCAL1-LexA con biblioteca de cDNA de <i>T. cruzi</i></i>	106
<i>Ensayos de interacción específica</i>	108
3.18 Estudios de co-localización de TcCAL1 con sus pares de interacción	109

3.20 Predicción de interacciones de TcARM y TcPFD con TcCAL1.....	110
4. Discusión	115
5. Anexos	135
<i>Predicción de palmitoilación de TcARM</i>	136
<i>Purificación de TcCAL 1x6His a partir de epimastigotes mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA</i>	136
<i>Identificación de proteínas asociadas a TcCAL 1 por co-inmunoprecipitación (CoIP)</i>	137
<i>Composición de aminoácidos de TcCAL 1x6His.</i>	141
6. Bibliografía.....	142

1. Introducción

1.1 La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana

La enfermedad de Chagas, producida por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, fue descrita por el médico Brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas. En el año 1907, Chagas emprendió una campaña contra la malaria en el estado brasileño de Minas Gerais en donde observó organismos flagelados provenientes de muestras de intestinos de vinchucas colectados en la zona. A partir de muestras de los triatominos, realizó inoculaciones en animales para reproducir, aislar e identificar el parásito al cual llamó *Trypanosoma cruzi* en honor a su mentor Oswaldo Cruz. Años después, Chagas estableció el primer caso humano de la enfermedad al detectar un tripanosoma similar en la sangre de Berenice, una niña de dos años de edad quien presentaba fiebre, hepatomegalia y esplenomegalia (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2023; Pérez-Molina and Molina, 2018). Las observaciones de Carlos Chagas lo llevaron a realizar el “descubrimiento triple reverso”; primero identificando el vector, luego el parásito y finalmente la enfermedad en humanos. La Enfermedad de Chagas fue presentada a la comunidad científica mediante su publicación en el año 1909 (Chagas, 1909; Chao *et al.*, 2020). Luego, Salvador Mazza confirmó la existencia de *T. cruzi* y la misma enfermedad en la provincia de Jujuy en Argentina, en donde el vector triatomino tenía distribución en zonas rurales (Mazza, 1949). Una de las mayores contribuciones de Mazza y su equipo, desde el punto de vista de diagnóstico clínico, fue la descripción del síndrome conjuntival o también llamado signo de Romaña, como un síntoma agudo de la enfermedad de Chagas (Romaña 1935).

La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de Latinoamérica y se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile. En las últimas décadas, esta enfermedad ha comenzado a ser un problema de salud pública en áreas no endémicas como Canadá, Europa, Japón y Australia debido a la grandes migraciones latinoamericanas actuales (Lidani *et al.*, 2019). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre 6-7 millones de personas están infectadas con el parásito y hay cerca de 100 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (Lidani *et al.*, 2019). La principal vía de transmisión del parásito en zonas endémicas es vectorial, sin embargo, la infección también puede ocurrir por vía congénita desde la madre infectada a su hijo recién nacido, por ingestión de alimentos contaminados con las formas infectivas del parásito, trasplante de órganos, transfusiones de sangre infectada con el parásito y en menor medida, por accidentes de laboratorio (Abas *et al.*, 2022; Sosa-Estani and Segura, 2015).

1.2 Manifestaciones clínicas y tratamiento de la Enfermedad de Chagas

El curso de la Enfermedad de Chagas provoca en el humano diferentes manifestaciones clínicas de acuerdo a la fase de la infección. La fase aguda se caracteriza por la presencia de formas tripomastigotes del parásito en sangre periférica, los cuales pueden ser fácilmente observados por microscopia óptica en muestras frescas. Durante esta fase, sólo el 5% manifiestan síntomas entre 8 y 10 días después de la infección por contacto con heces infectadas durante la picadura del triatmino, o de 20 a 40 días después de la transfusión con sangre infectada. Los síntomas suelen ser inespecíficos y los pacientes pueden presentar fiebre prolongada, vómitos, inflamación de los nódulos linfáticos, edema subcutáneo localizado o generalizado, hepatomegalia y esplenomegalia. Si la inoculación del parásito es cercana a la mucosa ocular, se desarrolla una lesión característica con un edema periorbital unilateral y conjuntivitis o también llamado “signo de Romaña” (Rassi *et al.*, 2012, 2010; Tanowitz *et al.*, 1992; Teixeira *et al.*, 2006). En la fase indeterminada, hay baja parasitemia y los signos y síntomas desaparecen a pocos meses luego de la infección. Esta fase puede durar desde meses hasta toda la vida (Machado *et al.*, 2012; Pérez-Molina and Molina, 2018; Rassi *et al.*, 2010). Luego, durante la fase crónica de la infección con *T. cruzi*, los pacientes pueden no presentar síntoma alguno, y permanecer así por el resto de su vida o desarrollar alteraciones cardíacas, digestivas o ambas, siendo la cardiomiopatía la manifestación clínica más frecuente y severa (Hemmige *et al.*, 2012; Rassi *et al.*, 2012).

Desde 1970, sólo dos drogas anti-tripanosoma se encuentran disponibles nifurtimox y benznidazol, que son componentes nitro-heterocíclicos cuyo efecto citotóxico y genotóxico se da por liberación de radicales electrófilos; nitro-aniones, radicales hidroxilos (OH⁻), radicales superóxidos (O₂²⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Lidani *et al.*, 2019; Urbina, 2002). Sin embargo, ambas drogas requieren administración prolongada, pueden causar serios efectos secundarios y su eficacia en la fase crónica es insatisfactoria (Docampo, 1990; Urbina, 2002). Las fallas en el tratamiento han sido relacionadas a cepas resistentes naturales a benzimidazoles (Murta *et al.*, 1998; Murta and Romanha, 1998). Estas diferencias en la susceptibilidad/resistencia a las drogas, parece estar asociada a la variabilidad genética de las diferentes cepas o unidades discretas de tipificación (UDTs) de *T. cruzi* (Martínez *et al.*, 2013; Vela *et al.*, 2021). Todas estas limitaciones mantienen la búsqueda de un tratamiento quimioterapéutico eficaz en todas las fases de la enfermedad y con el mínimo de efectos adversos en el humano.

1.3 Clasificación y diversidad genética de *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo que pertenece al filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae. En esta última se agrupan parásitos flagelados del género *Leishmania* y *Trypanosoma*, causantes de grandes problemas de salud en el humano. El subgénero *Schizotrypanum* ha sido adaptado a tripanosomas que desarrollan sus estados intracelulares en vertebrados (Rassi *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2012).

La gran heterogeneidad biológica, bioquímica y molecular de *T. cruzi* llevó a una la clasificación de las poblaciones del parásito. En el año 2009, un consenso internacional clasificó la cepas de *T. cruzi* en seis linajes o unidades discretas de tipificación (UDTs): de TcI a TcVI y luego se añadió un séptimo linaje, llamado Tcbat (Zingales *et al.*, 2009). Este factor, asociado con la cepa del parásito, se ha relacionado con la distribución geográfica en escenarios epidemiológicos y manifestaciones clínicas que aún son poco entendidas. Como se mencionó, cada vez más estudios evidencian que la variada composición genética del parásito es responsable de distintas respuestas al tratamiento, así como también al diagnóstico de la enfermedad de Chagas (De Sousa *et al.*, 2024; Velásquez-Ortiz *et al.*, 2022).

1.4 Ciclo de vida de *T. cruzi*

T. cruzi, presenta un ciclo de vida complejo, que involucra diferentes estadios de desarrollo y dos hospedadores, uno vertebrado y un insecto vector hematófago (Familia Reduviidae, subfamilia Triatominae). En la vía vectorial de transmisión, el insecto ingiere sangre con la forma tripomastigote circulante (también llamados tripomastigotes sanguíneos) tras la picadura del hospedador vertebrado infectado. Los parásitos en el tracto digestivo del triatomo se diferencian a la forma replicativa no infectiva epimastigote. Éste último, migra al intestino posterior del insecto, en donde se adhiere a membranas perimicrovellitarias para diferenciarse al estadio no replicativo tripomastigote metacíclico altamente infectivo para mamíferos. La infección al hospedador mamífero ocurre tras la picadura del triatomo, con la liberación de las heces que contienen tripomastigotes metacíclicos que entran en contacto con mucosas o lesiones en la piel en la zona de la picadura. En el hospedador vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos son fagocitados por células del sistema inmune o macrófagos localizadas en tejidos. Los parásitos, dentro de la vacuola parasitófora de los macrófagos se diferencian en amastigotes intracelulares, que seguidamente son liberados al citoplasma en donde comienzan su replicación por fisión binaria. Una vez

que la célula se encuentra totalmente cargada de amastigotes, éstos se diferencian nuevamente en tripomastigotes y provocan el estallido de la célula. Al ser liberados, los tripomastigotes derivados de células infectan tejidos adyacentes y se extienden a través de las vías del torrente sanguíneo y linfático a células con músculo liso, cardíaco, esquelético y células ganglionares en donde se puede iniciar un nuevo ciclo de replicación intracelular. El ciclo de transmisión se completa cuando el insecto vector ingiere sangre nuevamente con tripomastigotes sanguíneos (Figura 1) (De Souza *et al.*, 2010; Medina-Rincón *et al.*, 2021; Rassi *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2012).

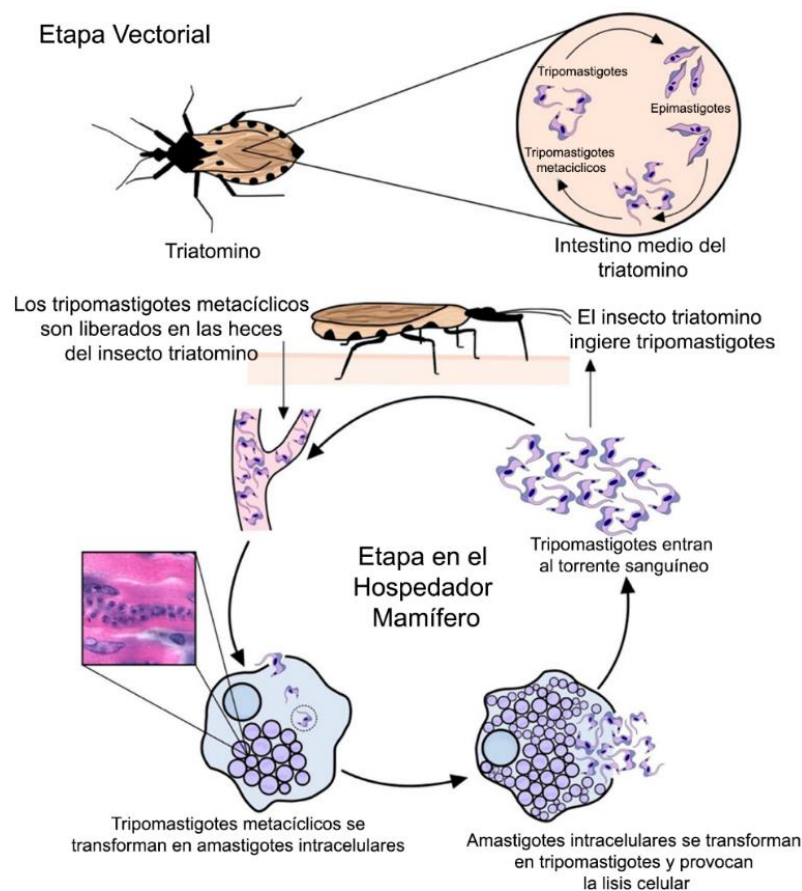


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. El ciclo comprende dos estadios en el insecto vector, epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y dos en el hospedador mamífero, amastigotes intracelulares y tripomastigotes derivados de células. Figura tomada y modificada de (Medina-Rincón *et al.*, 2021)

Las tres especies de vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al humano son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. Históricamente, *T. infestans* ha sido el vector más importante en las áreas endémicas de la región subamazónica. La especie *R. prolixus* es la más importante en el norte de Sudamérica y América Central y *T. dimidiata* ocupa un área similar a *R. prolixus* pero se extiende hacia el norte en México (Rassi *et al.*, 2010). En Argentina, la distribución geográfica de *T.*

infestans coincide con el principal responsable de transmisión de *T. cruzi* en el Gran Chaco, una ecorregión que comprende secciones secas (occidentales) y húmedas (orientales) que se extienden principalmente sobre el norte de Argentina, el sureste de Bolivia y el oeste de Paraguay.

1.5 Características celulares, bioquímicas y genómicas de *T. cruzi*

Los organismos del orden Kinetoplastida, se caracterizan por tener ciertas peculiaridades celulares, bioquímicas y genómicas. Algunas de estas son las estructuras que componen la superficie celular como los microtúbulos subpeliculares, presentes en la mayoría de los eucariotas. Sin embargo, en *T. cruzi* estos microtúbulos presentes en la superficie interna de la membrana celular están estrechamente asociados entre sí y con la membrana a través de filamentos cortos, formando así un arreglo helicoidal a lo largo del eje central del cuerpo celular del parásito (Vidal and Souza, 2017).

El flagelo es una estructura presente en todos los estadios de *T. cruzi*, su tamaño varía desde 1 μm de longitud en los amastigotes y cerca de 20 μm en las formas elongadas del parásito. El bolsillo flagelar de los tripanosomátidos constituye una invaginación de la membrana plasmática en la región posterior de la célula, de la cual emerge el flagelo y representa una región altamente especializada en actividad endocítica, exocítica y en la que se localizan una gran cantidad de proteínas y enzimas (Souza, 2002).

Los tripanosomátidos poseen una única mitocondria alargada que alberga una compleja red de miles de cadenas de DNA circular concatenadas, conocida como kinetoplasto (DNAk). Este DNA del kinetoplasto puede organizarse en forma de maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos, con un tamaño de entre 20-40 Kb, con pocas copias por red codifican genes mitocondriales clásicos. Por su parte, los minicírculos (0.5-10 Kb) tienen miles de copias que codifican para pequeños ARN guías con funciones en edición o de modificaciones post-traduccionales. El kinetoplasto en *T. cruzi* se encuentra asociado al cuerpo basal flagelar (Berná *et al.*, 2021; Callejas-Hernández *et al.*, 2021; Lukeš *et al.*, 2002).

Otras características distintivas de estos organismos son: la transcripción de los genes nucleares en largas moléculas de ARN policistrónicos que luego son procesadas a mensajeros maduros por *trans-splicing*, la ausencia aparente de regiones promotoras definidos para la ARN polimerasa II (Chávez *et al.*, 2021a; Díaz-Viraqué *et al.*, 2023) y la peculiar compartimentación del metabolismo, en la que las primeras seis o siete enzimas

de la ruta glucolítica, β -oxidación y la síntesis de fosfolípidos se encuentran secuestradas en una organela similar a los peroxisomas, llamada glicosoma. (Hannaert *et al.*, 2003; Michels and Gualdrón-López, 2022).

Los tripanosomátidos también poseen acidocalcisomas, que son organelas que están conservadas desde las bacterias hasta el *homo sapiens*. En protozoos como *T. cruzi* estos constituyen reservorios de fosfatos que forman complejos con cationes como Na^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Ca^{2+} . Además poseen bombas y transportadores que participan en la regulación de iones en el interior del parásito (Docampo and Moreno, 2011).

El retículo endoplasmático en *T. cruzi* se encuentra en contacto con la membrana plasmática y los microtúbulos subpeliculares. En tripanosomátidos, esta organela tiene un rol en la homeostasis de Ca^{2+} del parásito, a través de una proteína que actúa como bomba, la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco-endoplasmático (SERCA). Esta proteína transporta iones Ca^{2+} con utilización de energía derivada de la hidrólisis de ATP y su actividad permite que el retículo endoplasmático almacene grandes concentraciones de Ca^{2+} similares al medio extracelular ($\sim 2 \text{ mM}$) (Benaim *et al.*, 2020). Por otro lado, el complejo de Golgi se ubica en la región anterior de la célula cerca del kinetoplasto y el bolsillo flagelar; el tamaño de sus cisternas varía dependiendo del estadio de desarrollo del parásito siendo más grande en las formas epimastigotes (Souza, 2002).

Otras estructuras características en *T. cruzi*, la constituyen el complejo citostoma-citofaringe y los reservosomas. El complejo citostoma-citofaringe está presente sólo en los estadios replicativos del parásito, se trata de una invaginación de la membrana del desde la parte anterior del parásito y que penetra profundamente hacia el citoplasma acompañado de un complejo de microtúbulos. Esta estructura celular que se observa como una apertura en la membrana con forma de embudo, juega un rol importante en la nutrición del parásito y en este sitio ocurre la internalización de macromoléculas vía vesículas endocíticas, que subsecuentemente son procesadas en los reservosomas (Okuda *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2016). Por otra parte, los reservosomas son organelos esféricos que miden alrededor de $0,7 \mu\text{m}$ de diámetro, están localizados principalmente en la región posterior de la célula y su función es acumular todas las macromoléculas que han sido ingeridas por el parásito a través de un proceso endocítico. Además, este compartimiento contiene grandes cantidades de cruzipaina la principal cisteín proteasa de *T. cruzi* (Sant'Anna *et al.*, 2004).

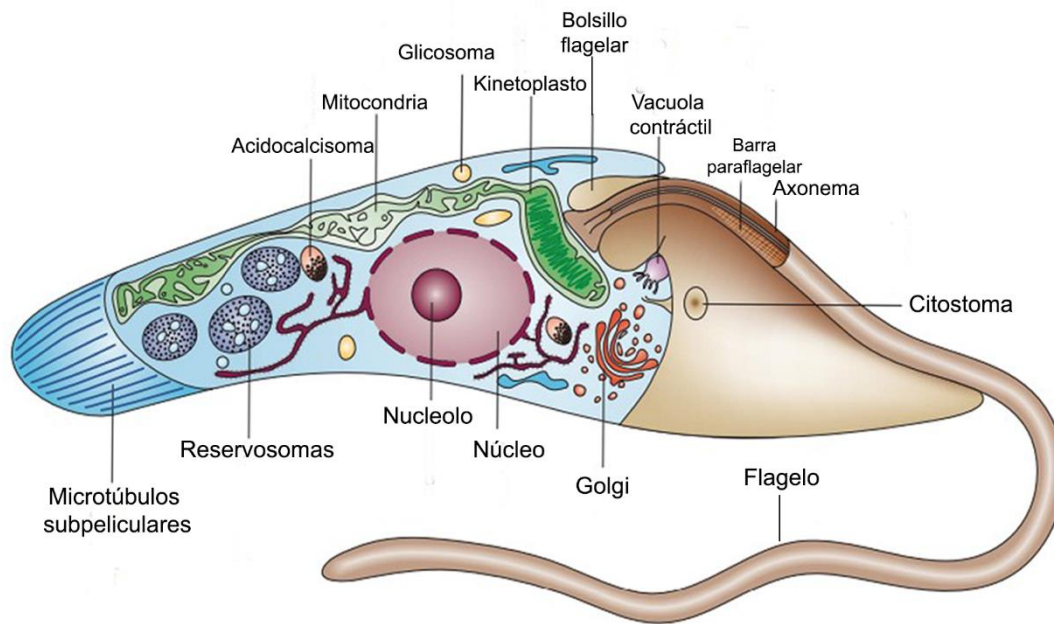


Figura 2. Representación esquemática de un epimastigote con un corte longitudinal. Se muestran las organelas internas. Tomado y modificado de (Docampo *et al.*, 2005).

1.6 Procesos regulados por Ca^{2+} en el ciclo de vida en *T. cruzi*

Muchos procesos del ciclo de vida del parásito están regulados por el Ca^{2+} . Entre los más relevantes se encuentran la diferenciación y algunos mecanismos de invasión del parásito a la célula hospedadora (Yoshida, 2006; Caradonna y Burleigh, 2011; Hashimoto *et al.*, 2016).

Durante la metacicloogénesis, la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en el parásito aumenta abrupta y temporalmente, independientemente de los niveles extracelulares de este ion. Esto sugiere que esta señal es desencadenada por reservorios intracelulares (Lammel *et al.*, 1996). Aunque los mecanismos específicos que explican el aumento de Ca^{2+} durante la metacicloogénesis no están claros, la evidencia experimental sugiere la participación de cascadas de señalización de dos mensajeros intracelulares claves, el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y el Ca^{2+} . En *T. cruzi* los acidocalcisomas y el complejo de la vacuola contráctil (CVC) son organelas ácidas que se han propuesto como depósitos de Ca^{2+} , con un papel en la osmorregulación del parásito (Patel and Docampo, 2010). El CVC participa en la regulación del volumen celular debido a que colecta los fluidos en exceso en el citoplasma y lo expulsa al medio extracelular a través de exocitosis (Rohloff *et al.*, 2004). Este proceso está regulado por canales mecanosensibles que son permeables a Ca^{2+} y a pequeños osmolitos orgánicos

(Dave *et al.*, 2021). Uno de los modelos propuestos es que, la alta osmolaridad del medio en el intestino del triatomo (600-900 mOsm)(Kollien *et al.*, 2001) provoca la activación de los canales mecanosensibles en el CVC del parásito, desencadenando la disminución del volumen celular que incluye la liberación de agua, aminoácidos no cargados y Ca^{2+} de la organela. A su vez, esta movilización promueve un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que activa a enzimas adenilato ciclasas (ACs), una familia de proteínas encargadas de la producción de AMPc (Dave *et al.*, 2021). El aumento de Ca^{2+} se ha propuesto que proviene del medio extracelular (Rohloff *et al.*, 2003). Sin embargo, el estrés osmótico promueve la fusión de los acidocalcisomas y el CVC, proceso en el que grandes cantidades de Ca^{2+} también podrían ser movilizadas (Docampo *et al.*, 2013; Lander *et al.*, 2021). Aunque en *T. cruzi*, se identificó una adenilato ciclasa (AC) que es sensible a Ca^{2+} , no se conoce el mecanismo de activación de esta proteína debido a que no tiene dominios canónicos de interacción con el catión (D'Angelo *et al.*, 2002). Sin embargo, la hipótesis que proponen algunos investigadores es que la AC sea activada por alguna proteína de unión a Ca^{2+} del flagelo donde se localiza esta proteína (Hamedi *et al.*, 2015). En el parásito la adhesión a las membranas microvellositarias del intestino de triatomo ocurre a través de la porción distal del flagelo, el cual es un proceso crucial para desencadenar la metaciclologénesis (Schmidt *et al.*, 1998).

Por otro lado, diversos estudios han calificado la invasión de *T. cruzi* como un proceso complejo que requiere distintas moléculas superficiales y la activación de múltiples vías de señalización tanto en los parásitos como en las células hospedadoras (Ferri and Edreira, 2021; Maeda *et al.*, 2012; Manchola *et al.*, 2016). En los parásitos la participación del Ca^{2+} durante el proceso de invasión no ha sido extensamente estudiado. Sin embargo, algunos trabajos reportaron que durante la invasión *in vitro* a células de mamífero, las mediciones con indicadores fluorescentes mostraron que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en tripomastigotes aumenta transitoriamente como consecuencia de la adhesión del parásito a la membrana externa de la célula hospedadora (Moreno *et al.*, 1994; Yakubu *et al.*, 1994). Un estudio más reciente, confirmó el aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en tripomastigotes derivados de células, cuando fueron expuestos a lisados proteicos de la matriz extracelular de células de mamíferos, así como la disminución de la invasión, cuando el flujo de ion fue bloqueado (Manchola Varón *et al.*, 2021).

El proceso de invasión de *T. cruzi* desde el punto de vista de la célula hospedadora se puede dividir en pasos que involucran la adhesión a la membrana

plasmática, el reconocimiento por la célula hospedadora, la internalización del parásito y la formación de la vacuola parasitófora.

En tripomastigotes metacíclicos tres proteínas se encuentran involucradas en el reconocimiento de la célula hospedadora, las glicoproteínas gp82, gp30 y gp35/50. Gp82 es una glicoproteína específica de tripomastigotes metacíclicos que se encuentra anclada en la superficie del parásito a través de glicofosfatidilinositol (GPI) pero también puede ser secretada. Durante la invasión de tripomastigotes metacíclicos, las moléculas de gp82, interactúan con sus receptores en la membrana de la célula hospedadora, conduciendo a la movilización de los lisosomas y de Ca^{2+} intracelular. Uno de los receptores identificados para gp82, es la proteína de membrana asociada a lisosomas (LAMP-2) (Rodrigues *et al.*, 2019). El incremento del Ca^{2+} citosólico necesario para la entrada de los tripomastigotes metacíclicos puede ser originado por una vía independientemente del inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), o tras la activación de la fosfolipasa C (PLC), generando diacilglicerol (DAG) e IP3. Este último promueve la liberación de Ca^{2+} desde compartimentos sensibles a IP3, como el retículo endoplasmático (Maeda *et al.*, 2012). En este proceso participan kinasas como la proteína kinasa C (PKC), mTOR una quinasa de Ser/Thr conservada que regula diversos procesos celulares y fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) (Maeda *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2015). Además, gp30, otra molécula de superficie específica de tripomastigotes metacíclicos es expresada en cepas de *T. cruzi* deficientes en gp82. La unión de gp30 a las células hospedadoras induce una respuesta de Ca^{2+} y exocitosis de lisosomas, mediante la activación de vías de señalización que involucran PI3K, mTOR y PKC (Cortez *et al.*, 2003). Por otra parte, gp35/50, se expresa en cepas de *T. cruzi* poco infectivas. Estas son glicoproteínas altamente glicosiladas similares a mucinas, enriquecidas en ácido siálico y residuos de galactosa que interactúan con la célula hospedadora a través de su porción de carbohidratos (Yoshida and Cortez, 2008). La unión de gp35/50 a las células hospedadoras desencadena una elevación intracelular de Ca^{2+} , pero en menor grado que gp82 (Ruiz *et al.*, 1998a). La invasión mediada por gp35/50 conduce al desensamblaje de microfilamentos de F-actina, un evento que puede estar asociado con la activación de la AC y producción de AMPc (Ferreira *et al.*, 2006).

La señalización desencadenada por los tripomastigotes derivados de células es diferente a la de tripomastigotes metacíclicos. En este caso diversas moléculas secretadas y/o expresadas en la superficie celular están implicadas en la internalización a la célula hospedadora. Entre ellas se encuentran: cruzipaina, trans-sialidasas (TS) y el

antígeno pequeño de superficie de tripomastigotes (TSSA) (Ferri & Edreira, 2021; Maeda *et al.*, 2012).

La trans-sialidasa (TS) de *T. cruzi*, es una molécula única en la superficie celular, que permite la transferencia de residuos de ácido siálico (AS) desde macromoléculas donantes de la célula hospedadora a proteínas tipo mucina en la membrana del parásito. Esta transferencia juega un papel crucial en la evasión de respuestas inmunitarias, favoreciendo la supervivencia y el establecimiento de la enfermedad crónica. Además, la TS también ha sido postulada como un contra-receptor en la unión de los tripomastigotes a receptores de ácido siálico en la célula hospedadora. Asimismo, el antígeno pequeño de superficie de los tripomastigotes (TSSA) es una proteína pequeña tipo mucina, que se encuentra en la superficie de tripomastigotes derivados de células (Cámara *et al.*, 2019). Esta proteína está involucrada en la interacción inicial del parásito con la célula hospedadora y se presenta en variantes alélicas, TSSA I a IV, de acuerdo a DTUs que se expresan en los linajes TcI a TcIV, respectivamente (Di Noia *et al.*, 2002). Los linajes híbridos TcV y TcVI presentan las isoformas TSSA II y TSSA III. Estas proteínas también inducen señalización de Ca^{2+} y las cascadas de señalización vía ERK1/2 o las clásicas vías de señalización MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Cánepa *et al.*, 2012).

Además, se ha propuesto que un factor secretado de estructura desconocida desencadena la movilización de Ca^{2+} mediada por IP3 en la célula hospedadora (Maeda *et al.*, 2012). El factor soluble se produce mediante la acción del oligopéptido B (OPB) citosólico, una enzima estrechamente relacionada con miembros de la familia de serina endopeptidasas. El agonista de Ca^{2+} , generado a partir de una molécula precursora en el citoplasma de los tripomastigotes derivados de células, es exportado y su reconocimiento por un receptor de célula hospedadora, seguido de la activación de PLC y la producción de IP3, libera Ca^{2+} del retículo endoplásmico (Burleigh *et al.*, 1997; Yoshida and Cortez, 2008). En este proceso también se activa la producción de AMPc que potencia la exocitosis lisosomal mediada por Ca^{2+} , así como la ruptura de filamentos de F-actina, lo cual promueve la internalización del parásito (Rodríguez *et al.*, 1999).

Otra enzima que produce agonistas de Ca^{2+} , es la cruzipaina, la principal cisteína proteinasa de *T. cruzi* expresada en todas las formas de desarrollo (Paiva *et al.*, 1998). La cruzipaina actúa sobre el kininógeno unido a la célula hospedadora y genera bradiquinina que, al ser reconocida por su receptor (B_2R), desencadena la entrada de Ca^{2+} mediada por IP3 promoviendo así la invasión del parásito (Scharfstein *et al.*, 2000).

La complejidad del proceso de invasión implica muchas otras vías de señalización intracelular que se desencadenan en la célula hospedadora. Muchas otras moléculas secretadas por el parásito capturadas en vesículas extracelulares también cumplen un papel crucial en este proceso (Maeda *et al.*, 2012; Manque *et al.*, 2003).

El parásito, además, ha desarrollado varios mecanismos como estrategia para su internalización en las células hospedadoras, los cuales incluyen: reclutamiento de lisosomas dependiente de Ca^{2+} , endocitosis y autofagia.

La motilidad flagelar de los tripomastigotes adheridos provoca daños en la membrana plasmática de las células hospedadora, lo que desencadena la internalización del parásito tomando ventaja de los mecanismos de reparación. Esta vía de invasión es activada por la entrada de Ca^{2+} y oxidantes desde el exterior de la célula e implica la fusión de lisosomas con la membrana celular. La enzima lisosomal esfingomielinasa ácida (EMA), responsable de descomponer la esfingomielina en ceramida, también es secretada durante la lesión celular, lo que promueve la reparación de la membrana plasmática. Las moléculas de la superficie que desencadenan la liberación de Ca^{2+} desde compartimientos intracelulares promueven el aumento de los niveles de AMPc por activación de PLC. EL AMPc a su vez, es capaz de potenciar la exocitosis dependiente de Ca^{2+} y la invasión celular mediada por lisosomas. A diferencia de muchos patógenos intracelulares que evitan hábilmente el contacto con los lisosomas de la célula hospedadora, *T. cruzi* requiere del ambiente de bajo pH para iniciar la salida de la vacuola parasitófora y la entrada al citoplasma de la célula hospedadora, donde tiene lugar la replicación. Por lo tanto, el tráfico hacia y la residencia transitoria dentro de los lisosomas de la célula hospedadora es necesario para el establecimiento de la infección en células de mamíferos por *T. cruzi*.

La endocitosis independiente de lisosomas se ha propuesto como el principal mecanismo de entrada para *T. cruzi*. Este mecanismo incluye la endocitosis mediada por clatrina, caveolas, microdominios de membrana, macropinocitosis y fagocitosis (Chou *et al.*, 2011 Barrias *et al.*, 2013). La presencia de vesículas endocíticas recubiertas de clatrina durante la internalización de *T. cruzi* que fue evidenciada en estudios de inmunofluorescencia sugirió la participación de este mecanismo durante la invasión del parásito (Barrias *et al.*, 2013). El ingreso de tripomastigotes a través de procesos fagocíticos fue demostrado por primera vez en estudios en macrófagos peritoneales de línea celular L929 y HeLa, mediante el tratamiento con citocalasina B, un fármaco que bloquea la extensión de los filamentos de actina, el cual inhibió la internalización del

parásito (Nogueira and Cohn, 1976). También, utilizando células musculares cardíacas y microscopía electrónica de transmisión, se evidenció que los tripomastigotes se unen e inducen un proceso fagocítico típico con extensiones de pseudópodos de la célula hospedadoras (Barbosa and Meirelles, 1995). Esto demuestra que el parásito es capaz de ingresar por esta vía tanto a fagocitos profesionales como no profesionales. Además, se demostró que el reconocimiento de los receptores tipo Toll 2 (TLR2) por los tripomastigotes activa el mecanismo de invasión dependiente de endosomas por la vía de los marcadores endosomales Rab5/Rab7, por activación de PI3K y la unión de Rab5 a endosomas tempranos (Maganto-Garcia *et al.*, 2008). Se evidenció que varias vías de señalización son activadas en los fagocitos profesionales al observar la activación de proteínas kinasas de tirosina durante el contacto inicial con los tripomastigotes, seguida por el reclutamiento de la PI3 kinasa, lo que culmina en la polimerización de los microfilamentos de actina y la extensión de pseudópodos (Wilkowsky *et al.*, 2001).

Por último, otro de los mecanismos que se demostró que actúa como modulador positivo de la invasión de *T. cruzi* es la autofagia, una vía catabólica que implica la autodigestión celular a través de la maquinaria lisosomal (Salassa and Romano, 2019). La autofagia de la célula hospedadora ha sido descrita como uno de los principales reguladores de la invasión de *T. cruzi*, con posibles efectos en la maduración de la vacuola parasitófora (Salassa and Romano, 2019). La ruptura de la superficie celular producida por *T. cruzi* durante la invasión puede desencadenar la respuesta autofágica como un mecanismo para restaurar la integridad de la membrana plasmática. Las evidencias fueron demostradas por microscopía confocal, en donde observaron que las vesículas positivas para LC3-II (una proteína marcadora de la autofagia) se mueven hacia la membrana plasmática y entran en contacto con los sitios donde los tripomastigotes se unen a la membrana (Lai and Devenish, 2012; Salassa and Romano, 2019). Además, el estrés nutricional o la inducción farmacológica de la autofagia antes de la infección aumentaron significativamente el número de células infectadas, mientras que los inhibidores de esta vía redujeron la invasión (Romano *et al.*, 2009).

1.7 Homeostasis del Ca^{2+} en *T. cruzi*

La señalización de Ca^{2+} modula diversas actividades biológicas en las células eucariotas. El Ca^{2+} citosólico se une a un vasto número de efectores responsables de regular diferentes procesos dependientes del tipo celular, estableciendo vías de señalización únicas para cada célula (Berridge *et al.*, 2003). La alteración de la

homeostasis de Ca^{2+} en cualquier célula generalmente conduce a efectos letales que resultan en la muerte celular por apoptosis o necrosis (Zhivotovsky and Orrenius, 2011).

La evidencia experimental ha señalado la importancia de la señalización y la homeostasis del Ca^{2+} en la regulación de procesos claves del ciclo de vida de *T. cruzi*. La razón principal es, que los parásitos deben enfrentar cambios extremos en la concentración extracelular de Ca^{2+} durante diferentes etapas de su ciclo de vida. En epimastigotes y tripomastigotes dentro del insecto hospedador, la concentración extracelular de Ca^{2+} se encuentra en el rango de milimolar, pero para los amastigotes dentro de las células musculares cardíacas, esta concentración cae muy por debajo del rango submicromolar. En las células eucariotas en general, la regulación intracelular de Ca^{2+} es una condición *indispensable* para la función de este catión como molécula señalizadora, que es lograda mediante la participación concertada de varios mecanismos ubicados en orgánulos intracelulares y en la membrana plasmática (Benaim *et al.*, 2020).

Los principales reservorios intracelulares identificados hasta ahora para el almacenamiento y la movilización de Ca^{2+} en el parásito son los acidocalcisomas, el retículo endoplásmico y la mitocondria (Chiurillo *et al.*, 2020a; Lu *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 2012). Además, se han identificado y/o caracterizado canales de transporte de Ca^{2+} en estas organelas, así como en las membranas plasmáticas y flagelares, que manejan la movilización, el flujo y el bombeo de Ca^{2+} entre los diferentes compartimentos y el entorno extracelular (Chiurillo *et al.*, 2019; Dave *et al.*, 2021; Furuya *et al.*, 2000; Hamedi *et al.*, 2015; Ramakrishnan and Docampo, 2018).

Estas organelas tienen la capacidad de reestablecer los niveles de Ca^{2+} en los parásitos. Al igual que los acidocalcisomas, la mitocondria puede acumular grandes cantidades de Ca^{2+} a través de un uniportador mitocondrial (MCU). Este canal utiliza el gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana mitocondrial interna para disipar energía a medida que se acumula Ca^{2+} (Docampo and Huang, 2015). El MCU está ampliamente conservado a lo largo de la evolución, presente en todas las mitocondrias hasta ahora descritas, incluida la única mitocondria de los tripanosomátidos (Docampo *et al.*, 2014). La baja afinidad del MCU por el Ca^{2+} hizo que durante mucho tiempo no se considerara como un regulador real de este ion. Sin embargo, se demostró que la sobreexpresión las proteínas del complejo MCU aumenta la captación mitocondrial de Ca^{2+} y la eliminación de cualquiera de los genes *mcu* mediante el sistema CRISPR/Cas9 conduce a la pérdida de dicha función, aunque el potencial de membrana mitocondrial

se mantiene (Bertolini *et al.*, 2019). La aplicación del sistema CRISPR/Cas9 también fue importante para identificación en *T. cruzi* de una fosfatasa de la enzima piruvato deshidrogenasa mitocondrial (TcPDP) sensible a la concentración fisiológica de Ca^{2+} , la cual es capaz de estimular la actividad de una PD mitocondrial, impulsando el metabolismo energético a través de la activación del ciclo de Krebs (Lander *et al.*, 2018). Estos hallazgos también muestran las importantes funciones que cumple el Ca^{2+} en la bioenergética de *T. cruzi*.

Por otro lado, el retículo endoplásmico posee una Ca^{2+} -ATPasa sarcoendoplasmática (SERCA), que transporta el catión a expensas de la hidrólisis de ATP y tiene una alta afinidad por el Ca^{2+} , lo que permite mantener una alta concentración de Ca^{2+} dentro de este orgánulo que es similar al medio extracelular ($\sim 2 \text{ mM}$) (Benaim and Garcia, 2011). La liberación de Ca^{2+} desde el retículo se ha postulado que puede ser una función que ejerce un canal de la familia de las presenilinas, sin embargo, esta función no ha sido completamente dilucidada (Docampo and Huang, 2015) .

El retículo endoplásmico, la mitocondria y los acidocalcisomas actúan en conjunto, siempre que ocurre un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, participando en restauración de los niveles basales fisiológicos de este ion. Sin embargo, la capacidad de estos orgánulos está limitada por su volumen como compartimentos. De esta forma, los mecanismos de regulación ubicados en la membrana plasmática son responsables de la homeostasis a largo plazo del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En *T. cruzi*, se ha identificado y caracterizado una Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), responsable de expulsar este ion al espacio extracelular (Benaim *et al.*, 1991). Esta bomba tiene una afinidad muy alta por el Ca^{2+} y es estimulada por calmodulina (CaM), la proteína de unión al Ca^{2+} , presente en todas las células eucariotas (Benaim and Villalobo, 2002). Asimismo, el mecanismo encargado de ingresar el catión hacia el espacio intracelular esta mediado un canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática activado por esfingosina. Este canal fue caracterizado electrofisiológicamente y responde de manera similar al canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L (VGCC) de humanos, ya que se inhibe por nifedipina y se activa por compuesto agonista Bay K8644. Sin embargo, difiere en que no parece ser un canal dependiente de voltaje (Rodríguez-Durán *et al.*, 2019). Las diferencias en la estructura, ubicación y regulación encontradas en algunos de estos canales en comparación con los presentes en células de mamíferos, además de su relevancia en la fisiología del parásito, hacen que estos sean interesantes de investigar como blanco para el tratamiento terapéutico (Benaim *et al.*, 2020).

Como es esperable, las proteínas que unen Ca^{2+} (CBP, por sus siglas en inglés *calcium binding proteins*) también son protagonistas en la regulación y homeostasis de este ion (Chazin, 2011). Presentan diversas funciones desde el mantenimiento de la homeostasis intracelular hasta la modulación de la actividad enzimática. Sin embargo, se han caracterizado pocas CBP que contienen dominios *EF-hand* en *T. cruzi*. Entre ellas, se ha demostrado que la calmodulina modula la actividad de enzimas como las ATPasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} y la fosfodiesterasa cíclica AMP (Benaim *et al.*, 1991; Téllez-iñón *et al.*, 1985). Además, otras CBPs se han caracterizado funcionalmente en cierta medida. En este sentido, la quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina CaMK II, la subunidad reguladora de la calcineurina B y la proteína de unión al Ca^{2+} del flagelo FCaBP se han implicado en la proliferación de epimastigotes (Nogueira *et al.*, 2011; Souza, 2009), la invasión de células huésped de mamíferos (Araya *et al.*, 2008) y el ensamblaje del flagelo (Wingard *et al.*, 2008), respectivamente. Calreticulina, una CBP que carece de dominios *EF-hand*, se ha demostrado que desempeña un papel en la infección por *T. cruzi* (Sánchez-Valdéz *et al.*, 2014). A su vez, el Ca^{2+} modula la actividad enzimática en varias proteínas, como la adenilil ciclasa, que está involucrada en la movilidad del parásito (D'Angelo *et al.*, 2002).

Desde la anotación de los genomas de *T. cruzi*, se han identificado varias CBPs y canales de Ca^{2+} (El-Sayed *et al.*, 2005; Shanmugasundram *et al.*, 2023). Estas proteínas probablemente generan las fluctuaciones en la concentración de calcio y descifran sus señales, aunque la mayoría de ellas siguen sin caracterizarse. Además, muchos de los genes que las codifican están anotados como proteínas hipotéticas dado que carecen de homología significativa en otros organismos. En el genoma de *T. cruzi*, la proteínas hipotéticas novedosas, de función desconocida y exclusivas de los tripanosomátidos representan aproximadamente el 39% de los genes codificantes (Berná *et al.*, 2018). Descifrar su función llevaría a la identificación de nuevos objetivos quimioterapéuticos contra estos patógenos.

1.8 Antecedentes

1.8.1 TcCAL1 en *T. cruzi*

Con el objetivo de identificar nuevas moléculas involucradas en la regulación y homeostasis del Ca^{2+} en *T. cruzi* y avanzar en el conocimiento de estos procesos, se realizó una búsqueda de secuencias codificantes para proteínas en las bases de datos TriTrypDB y TDRtarget (Alsford *et al.*, 2011; Aslett *et al.*, 2010). Esta búsqueda se diseñó para identificar aquellas proteínas que estaban anotadas como hipotéticas, que tuvieran

dominios de unión a calcio y que existiera evidencia de expresión por experimentos de proteoma, utilizando palabras clave como motor de búsqueda en la interfaz disponible en el portal <http://tritrypdb.org/>, donde se deposita la anotación de los genomas y datos experimentales de *T. cruzi* y otros tripanosomátidos. A partir de ese conjunto de datos, se seleccionaron aquellas secuencias cuyo RNA de interferencia de los genes ortólogos en *Trypanosoma brucei* presentaran un fenotipo detrimental para la proliferación y/o diferenciación. Esta secuencia de pasos se esquematiza en la Fig. 3 y se resume como sigue: 1. selección de secuencias anotadas como proteínas hipotéticas de los genomas de *T. cruzi* (acceso 1 de marzo de 2022) 2. exclusión de secuencias con cualquier supuesto de función asignada, 3. selección de proteínas hipotéticas con dominios *EF-hand* predichos, 4. secuencias con evidencia experimental de expresión por análisis de proteoma, 5. secuencias con ortólogos en *T. brucei*, 6. secuencias cuyos ortólogos en *T. brucei* revelaron esencialidad en procesos de diferenciación y proliferación.

Como resultado, se encontró que 33 secuencias de genes de *T. cruzi* cumplían con estos criterios de selección (Fig. 3). Se eligió para su posterior estudio, un gen que codifica para una proteína de 103 aminoácidos que presenta dos motivos de unión a Ca^{2+} del tipo *EF-hand*, a la cual denominamos TcCAL1. Por diversos estudios de análisis de proteoma, se detectaron péptidos que confirman la expresión del gen que codifica para TcCAL1, ya sea en todos los estadios de *T. cruzi*, como así también en la superficie celular de epimastigotes (Atwood, 2005; Queiroz *et al.*, 2014). A través de análisis bioinformáticos, se encontró que TcCAL1 presenta un sitio putativo de palmitoilación cercano a su extremo C-terminal. La unión covalente de ácido palmítico a residuos de cisteína es una modificación post-traducciona reversible que juega un papel muy importante en la función proteica, ya que regula la estabilidad, tráfico intracelular e interacción con otros componentes (Aicart-Ramos *et al.*, 2011).

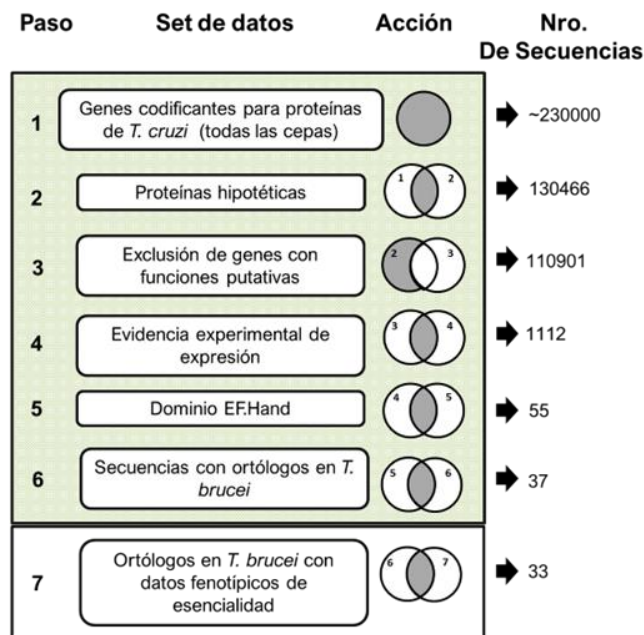


Figura 3. Representación esquemática de los criterios de selección usados en las bases de datos TriTrypDB y TDRtargets para la selección del gen *tcca1*. El conjunto de datos usados y el número resultante de genes se muestran en cada paso. El diagrama de Venn esquematiza cada acción realizada. Los rectángulos sombreado y vacío representan la búsqueda realizada en la base de datos TriTrypDB y TDRtargets, respectivamente.

1.9 Hipótesis de trabajo

En base a lo expuesto anteriormente, se propone que TcCAL1, debido a la presencia de dos dominios *EF-hand* de unión a Ca^{2+} tiene actividad reguladora y/o de censado de dicho ion en el espacio intracelular de *T. cruzi*. También, se propone que TcCAL1 se asocia a otras proteínas y modula su función. Esta regulación, a su vez, podría ser dependiente de la unión a Ca^{2+} o de sus modificaciones postraduccionales.

1.10 Objetivos

Este proyecto se propuso llevar a cabo experimentos para probar la hipótesis propuesta y dilucidar la función de esta nueva proteína. Se planteó como **objetivo general**, caracterizar funcionalmente a TcCAL1 y evaluar su relevancia en varios aspectos del ciclo de vida de *T. cruzi*. Para esto, se plantean los objetivos específicos:

- 1- Realizar un estudio *in silico* de TcCAL1: evaluación del plegamiento tridimensional y la afinidad por calcio, posibles modificaciones postraduccionales e interacciones proteína-proteína.
- 2- Identificar las moléculas que interaccionan con TcCAL1.

- 3- Determinar la localización subcelular de *TcCAL1* y sus pares de interacción en diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.
- 4- Estudiar el fenotipo de la sobreexpresión, así como también del silenciamiento de *TcCAL1* en *T. cruzi* y evaluar su efecto en los procesos de proliferación, infección y diferenciación.
- 5- Cuantificar los niveles de Ca^{2+} intracelular de *T. cruzi* en función de la sobreexpresión o el silenciamiento de *TcCAL1*.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos

2.1.1 Soluciones

- PBS 1X: 0.275% (p/v) NaHPO_4 , 0.07% (p/v) NaH_2PO_4 , 0.8% (p/v) NaCl , 0.08% (p/v) KCl , pH 7.4.
- *Buffer* de corrida TAE 50X: Tris base 2M, ácido acético glacial 2M, EDTA 50 mM, pH 8.
- Tris-Glicina 10X: Tris base 0.25 M, glicina 1.92 M.
- *Buffer* de corrida en *SDS-PAGE*: Tris-Glicina 1X, 0.1% (p/v) SDS.
- *Buffer* de muestra 4X: 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% (p/v) SDS, 40% (v/v) glicerol, 20% (v/v) β -mercaptoetanol o 0.4 M DTT, 0.02% (p/v) azul de bromofenol.
- *Buffer* de transferencia de proteínas: Tris-Glicina 1X, 20% (v/v) metanol.
- Solución de bloqueo en *Western blot*: PBS 1X, 5% (p/v) leche descremada en polvo.
- Solución de bloqueo en Inmunofluorescencia: PBS 1X, 1% BSA.
- Coomassie coloidal: 18% (v/v) Metanol, 17% (p/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% (v/v) H_3PO_4 , 0.5 g/L Coomassie Blue G-250.
- *Buffer* de electroporación epimastigotes de *T. cruzi*: PBS 1X, 0.1 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 .
- Reactivo de Bradford: 31 % (v/v) etanol, 58%(v/v) ácido fosfórico, 0.1% (p/v) coomasie G-250.
- *Buffer Z*: 60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl , 1 mM MgSO_4 pH 7.
- *Buffer Z* con X-Gal: Adicionar 25 μL de 50 mg/mL X-Gal y 8 μL de 14 M β -mercaptoetanol por cada 3 mL de *Buffer Z*.

2.1.2 Anticuerpos

Tabla1. Características de los anticuerpos utilizados y su abreviatura.

Anticuerpo	Abreviatura	Procedencia
Goat anti-mouse IgG HRP conjugate	anti-mouse HRP	MERK, USA. Catálogo #401215
Goat anti-rabbit IgG HRP conjugate	Anti-rabbit HRP	Calbiochem, USA. Catálogo #401315
Goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Anti-mouse Alexa 488	ThermoFisher Scientific, USA. Catálogo #A28175
Goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 546	Anti-Mouse Alexa 546	ThermoFisher Scientific, USA. Catálogo #A11010

Mouse anti-Tubulin, Tyrosine, clone TUB-1A2, monoclonal	Anti-TUB	Sigma, USA. Catalogo # SAB4200776
Antisuero policlonal de ratón anti-TcCAL1x6His	Anti-CAL1	Obtenido en este trabajo por inmunización de ratones en el laboratorio
Antisuero policlonal de ratón Anti-Cyp19	Anti-Cyp19	Obtenido en otro trabajo del laboratorio por inmunización de ratones en el laboratorio
Rabbit Anti-HA tag antibody, clone 16B12	Anti-HA	Covance, USA. Catalogo # PRB-101C

2.2 Medios de cultivo

- **Infusión de Hígado-Triptosa (LIT):** 0.4% (p/v) NaCl, 0.5% (p/v) bacto triptosa, 0.5% (p/v) infusión de hígado, 0.4% (p/v) KCl, 0.8% (p/v) Na₂HPO₄, 20 mM glucosa, 20 µM hemina, 10 U/mL penicilina and 10 mg/mL estreptomicina.
- **Bifásico agar sangre/LIT (BAL):** La fracción correspondiente a la fase sólida se preparó con 0.3% (p/v) extracto de carne, 0.5% (p/v) peptona, 0.8% (p/v) NaCl, 1.5% (p/v) agar y se suplementó con 10% (v/v) de sangre humana. La fase sólida fue añadida en tubos de 15 mL para formar cuñas y para la fase líquida se utilizó medio LIT suplementado con 10% de SFB y el antibiótico requerido, según se indique.
- **RPMI-1640:** Medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (Sigma, USA).
- **MEM: Medio** Minimum Essential Medium (Gibco, USA).
- **Medio Luria-Bertani (LB):** 0.1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 1% (p/v) NaCl, pH 7.
- **Medio Luria-Bertani agar (LB-agar):** 0.1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 1% (p/v) NaCl, 15g/L agar, pH 7.
- **Medio YPAD (Yeast extract peptone dextrose):** 1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona de carne, 0,2% (v/v) adenina, 2% (v/v) D-glucosa, pH 7.4.

- **Medio YPA:** Medio YPAD sin glucosa
- **Medios SD (*Synthetic Drop-Out Medium*):** 0,17% (p/v) de base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos ni sulfato de amonio (BD Difco™, USA), 0.5 % (p/v) de sulfato de amonio, 1% (p/v) ácido succínico y 0.6% (p/v) de NaOH. Luego de autoclavar se agregó 2% (v/v) Glucosa 20% y aminoácidos y adenina (-WHULK) a 1X (a partir de stock 10X). De esta forma, son excluidos del medio selectivo triptófano (W), histidina (H), uracilo (U), leucina (L) y lisina (K). Para placas se agregó 2% (p/v) agar.
- **Aminoácidos y adenina “-WHULK” 10 X:** (Para 100 mL) se disolvió en H₂O desionizada 0,1 g de adenina, arginina, cisteína, treonina, y 0,05 g de asparagina, isoleucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina y valina. Se llevó a volumen con H₂O desionizada y se esterilizó por autoclave.
- **Aminoácidos y uracilo 100 X:** (Para 10 mL) se disolvió en H₂O desionizada 0,1 g de leucina, lisina, triptófano, uracilo o 0.05 g de histidina, según el caso. Se llevó a volumen con H₂O desionizada y se esterilizó por autoclave.

Medios SD selectivos utilizados:

- SD^{-WHULK}: SD sin triptófano, histidina, uracilo, leucina y lisina.
- SD^{-WULK}: SD sin triptófano, uracilo, leucina y lisina.
- SD^{-WUK}: SD sin triptófano, uracilo y lisina.
- SD^{-LUK}: SD sin leucina, uracilo y lisina.

2.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos especificados en la tabla 2, se utilizaron para la amplificación de secuencias codificantes, análisis de clones y secuenciación.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificación, análisis de clones y secuenciación.

Sitio blanco	Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Sitio de restricción /etiqueta
Secuencia codificante de <i>tccal1</i>	CAL1	GCGCCATGGCTATGCAACGCAGT CTAAT	NcoI
	CAL2	GCGGTCGACTCGCTGAGCAAAATT	Sall

Secuencia codificante de <i>tccal1</i>	CAL3	GCTCTAGAAATGCAACGAGTCTAAT	XbaI
	CAL4	GCGCATCGATCTCAGTGGTGGTGGT	Clal
HX1 del vector pTREX	TREX1	GTTTTATCCACTTATTATTGTTGTGTT A	--
GAPDH del vector pTREX	TREX2	GGACACGCATCGTGTATTATAAGAT	--
Secuencia codificante de <i>pdf</i>	Pfd1	GCGACTAGTATGTCTATTCTTAAGG GAAA	SpeI
Secuencia codificante de <i>pdf</i>	Pfd2	GCGCTCGAG TCA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA TTCGTCTTCCAGGTACACCT	XhoI Etiqueta HA
Secuencia codificante de <i>arm</i>	Arm1	GCGACTAGTATGCACCCTAATTTAG AA	SpeI
Secuencia codificante de <i>arm</i>	Arm2	GCGCTCGAG TCA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA CTCCCGTGGAAGATCTACCA	XhoI Etiqueta HA
5' del tracrRNA en pUC_sgRNA	RpUC	CAGTGGATCCAAAAAAGCACCGACT CGGTG	BamHI
3' del crRNA en pUC_sgRNA	FgRNA1	GATCGGATCCATGCAACGCAGTCTA ATCGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	BamHI
3' del crRNA en pUC_sgRNA	FgRNA53	GATCGGATCCCAACCGTCACCTCAA TTATGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	BamHI
Region HX1 del vector pTREX	HX1 reverse	TAATTTGCTTTTCGTGCGTG	--
Casette de Homologia	Ultrámero1	AGTAAGAAAAACAAAAACGAAACAAA CAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAA AAAAAAAAAAGAGGAAAAACAGAAG AAAAGGTTTATAAACAAAAATAAAAA TGGCCAAGCCTTTGTCTCA	--
Casette de Homologia	Ultrámero2	ATCGATGGGTGCTCCTAGAAATTTTA CATTTGATTTTTTTGTTGTTTTTGTG TTATTATTATTCCATTCTGATTGTTGT	--

CGTTCCTCAACGCCTGCTTTTTAGC			
CCTCCCACACATAAC			
Región interna			
del gen			
blastidina	P3	GATACAAGTCAGGTTGCCAGC	--
(Bsd)			
Región aguas			
arriba del gen	P4	GACTGGCAATGGAGGCTAAGG	--
tccal1			
3'UTR del gen	P2	ATTGGGGCATCCATTCACTCA	--
tccal1			
Sitio de	CALBTM1	GCCCCGGGGATGCAACGCAGTCTA	SmaI
clonado			
multiple del			
vector pBTM16	CALBTM2	CGCTGCAAGTCAGTGGTGGTGGT	PstI
de levaduras		G	
Reverse para	SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	--
secuenciación			
5' del pPV16	pPV16F	CTTGGAATTGACGAGTACGGT	--
3' del pPV16	pPV16R	GGCCAGTGAATTCGAGCTT	--

2.4 Vectores

- pZErO-2 (Invitrogen, cat. # V012362)
- pET-22b (+) (Novagen)
- pTEX (ATCC, cat. # 77316 TM)
- pTREX (Vázquez and Levin 1999)
- pUC_gRNA (Addgene, cat. #68710)
- pTREX-n/Cas9 (Addgene)
- pBTM116 (Addgene, cat. #111232)
- pVP16 (Addgene, cat. #1602-1)

2.5. Material biológico y cultivos celulares *in vitro*

2.5.1 Bacterias

- *E. coli* DH5α

Genotipo: F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF), U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-1 gyrA96 relA1 λ-).

- *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta

Genotipo: *F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR)*

Las bacterias fueron cultivadas en medio LB (líquido o agar) a 37 °C con agregado antibiótico de selección: ampicilina (100 µg/µL), kanamicina (100 µg/µL), cloranfenicol (10 µg/µL) según el caso. En el caso de medio líquido se cultivaron en agitación (300 rpm).

2.5.2 *Trypanosoma cruzi*

2.5.2.1 Epimastigotes cepa Y (TcII), CL (Tcl) y Dm28c (Tcl):

Las formas epimastigotes se cultivaron a 28 °C en medio LIT suplementado con 10% (v/v) de SFB. En el caso de las cepas transgénicas, conteniendo el vector recombinante pTREX/*tcca1x6His* o el vector pTREX vacío, se cultivaron con agregado del antibiótico de selección geneticina (G418) (Invivogen, USA) a una concentración final de 500 µg/mL.

Los epimastigotes transgénicos sometidos a edición genética mediante CRISPR/Cas9 fueron crecidos a 28 °C en medio LIT en presencia de 500 µg/mL de G418 y blasticidina (Bsd) 15 µg/mL (Gibco, USA).

2.5.2.2 Tripomastigotes metacíclicos (cepa Y):

Las formas tripomastigotes metacíclicas se cultivaron en medio bifásico agar sangre/LIT a 28 °C.

2.5.2.3 Amastigotes axénicos (cepa Y y Dm28c):

Los amastigotes axénicos se cultivaron a 37 °C en medio MEM ácido (pH 5) suplementado con 0.4% de albumina de suero bovino (BSA).

2.5.2.4 Tripomastigotes derivados de células (cepa Dm28c):

Los tripomastigotes derivados de células se cultivaron a 37 °C en medio RPMI suplementado con 5% de SFB.

2.5.3 Células Vero

Las células Vero (línea celular derivada de células epiteliales del riñón de mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*) se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂ en medio RPMI suplementado con 5% (v/v) de SFB.

2.5.4 Levaduras

- *Saccharomyces cerevisiae* (cepa L40):

Genotipo: MAT α his3 Δ 200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(*lexAop*)₄-HIS3 URA3::(*lexAop*)₈-lacZ GAL4. Esta cepa es capaz de crecer en ausencia de uracilo y de lisina, pero no de triptófano, leucina o histidina.

Las levaduras se cultivaron a 30 °C en medio YPAD o SD suplementados con aminoácidos según el marcador de selección.

2.6 Análisis *in silico* de la proteína TcCAL1

2.6.1 Análisis filogenético

Se utilizaron secuencias de proteínas homólogas de parásitos del orden Kinetoplastida, extraídos de la base de datos TriTrypDB (Aslett *et al.*, 2010) para construir un árbol filogenético de la proteína TcCAL1. La secuencia homóloga de *Bodo saltans* se utilizó como grupo externo. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el servidor MAFFT 7 y BLOSUM 62 como marcador matriz. El alineamiento múltiple se visualizó con MEGA-X (Kato *et al.*, 2019). El alineamiento múltiple se utilizó para realizar el análisis filogenético por el método de máxima verosimilitud en RAxML (Stamatakis, 2014) y ProtTest 3.4 para calcular los parámetros filogenéticos (Darriba *et al.*, 2011). Se eligió como test de filogenia un valor *Bootstrap* de 500 réplicas, que sirvió para calcular la robustez de cada rama del árbol empleando BOOSTER (booster.pasteur.fr/) (Lemoine *et al.*, 2018). Se utilizó FigTree para visualizar y editar el árbol filogenético (<https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

2.6.2 Predicción de estructura tridimensional y unión a Ca²⁺ por TcCAL1

La predicción de la estructura terciaria de la proteína se realizó con el programa AlphaFold2 disponible en Google Colab (AlphaFold2.ipynb - Colaboratory) (Jumper *et al.*, 2021; Mirdita *et al.*, 2022) a partir de la secuencia de aminoácidos. La predicción de formación de complejos proteicos se realizó el modo AlphaFold_multimer_v3 en parámetros por defecto y para optimizar la predicción se agregó un *linker* entre las secuencias de repeticiones de 21 residuos de glicina-glicina-serina antes de ejecutarlo como una sola cadena (Bryant *et al.*, 2022; Jumper *et al.*, 2021).

Los sitios de unión al ion calcio se predijeron usando el servidor COACH (<https://zhanggroup.org/COACH/>) y COFACTOR (<https://zhanggroup.org/COFACTOR/>) Para la obtención de los modelos tridimensionales de TcCAL1 con Ca²⁺, se utilizó el modelo de la proteína obtenido por AlphaFold y los datos de predicción de unión de los servidores COACH y COFACTOR. El montaje y edición de las estructuras se realizó con el software PyMOL 2.5.7.

2.6.3 Estudio de dominios de unión a Ca^{2+} *EF-hand*

Las diferentes secuencias de aminoácidos para estudiar los motivos *EF-hand* se obtuvieron de la base de datos TriTrypDB y en el caso de la calmodulina humana, del sitio NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El alineamiento de secuencias se realizó con el software ClustalW dentro de la aplicación de análisis de secuencias *Geneious prime* y la edición se realizó con las herramientas del mismo programa.

2.6.4 Predicción de modificaciones postraduccionales

Se utilizó el software CSS-Palm 4.0 (Ren *et al.*, 2008) para predecir los residuos potencialmente palmitoilables de la proteína a partir de su secuencia primaria.

2.7 Técnicas generales de ingeniería genética

2.7.1 Extracción de DNA genómico de *T. cruzi*

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de precipitados de 1×10^7 de epimastigotes de *T. cruzi* previamente lavados dos veces con PBS utilizando el ensayo comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Suiza) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.7.2 Amplificación de secuencias codificantes por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Se utilizó la enzima DNA taq polimerasa producida en nuestro laboratorio para amplificaciones preparativas o *Phusion DNA taq* Polimerasa (New England Biolabs - NEB, USA) para obtener secuencias con alta fidelidad. El volumen final de la reacción fue de 20, 25 o 50 μL , según el caso. Los programas de ciclado de las reacciones de PCR se determinaron tomando en cuenta la temperatura de fusión de los oligonucleótidos o temperatura de melting (T_m), la longitud del fragmento a amplificar o pares de bases (pb) y la procesividad de cada enzima.

2.7.3 Purificación de ácidos nucleicos

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de geles de agarosa o reacciones de PCR con el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*. Los vectores se purificaron con el kit *Plus SV Minipreps DNA purification system*. Para obtener grandes concentraciones de plásmidos se empleó el kit *Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System*. Todos los kits provienen de la casa comercial Promega y se usaron según las condiciones indicadas por el fabricante.

También se realizó la purificación de plásmidos mediante minipreparaciones a través del método de lisis alcalina de la siguiente manera:

Se obtuvieron precipitados a partir de 5-10 mL de cultivos bacterianos crecidos en LB líquido con el marcador de selección correspondiente. El precipitado se resuspendió en 100 μ L de *buffer* P1 (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa, pH 8). Luego, para lisar las células se agregaron 200 μ L de *buffer* P2 (0.2 N NaOH, 1 % (p/v) SDS). Se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Para precipitar el DNA genómico y proteínas, inmediatamente se agregaron 150 μ L de *buffer* P3 (3M KCH₃CO₂ pH 5). Nuevamente se mezcló suavemente por inversión. Para separar el DNA genómico del plasmídico, se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 12000 *xg*. Se recolectó el sobrenadante conteniendo el DNA plasmídico, y se incubó con 10 μ g/mL RNAasa-A, a 37°C durante 1 h. Luego, se realizó una extracción de proteínas con 400 μ L de cloroformo, se agitó por inversión hasta obtener una emulsión, y se centrifugó a 12000 *xg* durante 8 min para separar rápidamente la fase acuosa (conteniendo el DNA plasmídico) de la orgánica (proteínas). Se precipitó el DNA plasmídico mediante el agregado de 1 volumen de isopropanol. Se mezcló e incubó a -20°C, al menos 30 min. Se centrifugó a 12000 *xg* a 4°C por 30 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de 70 % (v/v) etanol frío. Se centrifugó a 12000 *xg* a 4°C por 15 min, se descartó el sobrenadante y se incubó brevemente a 37°C para evaporar el etanol residual. Por último, el precipitado se resuspendió en agua milliQ estéril.

2.7.4 Reacciones de digestión y ligación de ácidos nucleicos

2.7.4.1 Reacciones de digestión

Los fragmentos de DNA se clonaron tomando en cuenta los sitios de restricción presentes en las secuencias y en los vectores. Se usó 1 U de enzima de restricción (NEB) por cada 1 μ g de DNA. Cada pmol de vector digerido fue defosforilado con 1U de fosfatasa alcalina (Fermentas, USA), incubado a 37 °C por 30 min e inactivado por 65 °C durante 15 min. Las reacciones se llevaron a cabo en el *buffer* compatible con cada enzima incubando a 37 °C durante el tiempo recomendado por el proveedor para enzimas comunes o de alta fidelidad.

2.7.4.2 Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación se realizaron empleando la enzima T4 ligasa (NEB, USA), utilizando relaciones molares inserto: vector 3:1 y 10:1, respectivamente. El en

caso de las reacciones realizadas para la técnica CRISPR/CAS9 se usaron relaciones 10:1 y 20:1.

Los nanogramos (ng) de inserto para la reacción se calcularon según la fórmula:

$$ng \text{ de inserto} = \frac{ng \text{ vector} \times Kbp \text{ inserto}}{Kbp \text{ vector}} \times \text{relación inserto: vector}$$

Se emplearon 50 ng de vector, la cantidad de inserto calculada para cumplir las relaciones molares mencionadas, 400 U de enzima T4 Ligasa, *buffer* T4 ligasa 1X y agua milliQ estéril hasta completar 20 µL de volumen final de reacción. La mezcla se incubó durante toda la noche (ON) a 16 °C. Como control negativo se empleó la reacción de ligación en ausencia de inserto.

Se llevaron a cabo reacciones de restricción y ligación para realizar las siguientes construcciones:

- pET22b/*tccal1*
- pTREX/*tccal1x6His*
- pTEX/*pfdHA*
- pTEX/*armHA*
- pTREX/*pfdHA*
- pTREX/*armHA*
- pTREX-n/CAS9/*sgRNA1* y pTREX-n/CAS9/*sgRNA53*
- pBTM116/*tccal1*

2.7.5 Análisis de colonias recombinantes por *colony-PCR*

2.7.5.1 Colonias bacterianas

Se resuspendieron colonias bacterianas crecidas en presencia del marcador de selección en 10 µL de agua milliQ estéril y se incubaron a 98 °C durante 5 min. Se tomó 1 µL de esta la suspensión de bacteriana como molde en reacciones de PCR empleando la enzima *DNA taq* polimerasa.

2.7.5.2 Clones de epimastigotes

10⁷ parásitos se centrifugaron a 3000 xg por 5 min y se lavaron una vez en PBS. El precipitado se resuspendió en 30 µL agua milliQ estéril y se incubó a 95 °C por 5

min. Esta suspensión se centrifugó a 3000 xg por 5 min y el sobrenadante se trasvasó a un tubo nuevo para utilizarlo como molde en reacciones de PCR.

2.7.5.3 Colonias de levaduras

Se resuspendieron colonias de levaduras crecidas en presencia del marcador de selección en 50 μL de agua milliQ estéril y se incubaron a 98 °C durante 10 min. La suspensión se centrifugó a 3000 xg por 5 min y el sobrenadante se trasvasó a un tubo nuevo para utilizarlo como molde en reacciones de PCR.

2.7.6 Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización de fragmentos de DNA y vectores se emplearon geles de agarosa entre 0.8-1.5% (p/v). Las corridas se realizaron en *buffer* TAE 1X y los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.2-0.5 $\mu g/mL$). Se emplearon marcadores de DNA de 100 pb o 1 kb (productos biológicos PB-L, Argentina). El revelado se realizó bajo luz UV en un transiluminador.

2.7.7 Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de fragmentos de DNA o vectores se realizó por visualización de geles de agarosa comparando con marcadores de peso molecular (PB-L) o utilizando el equipo nanodrop *DS-11 DNA Quantification Spectrophotometer* (DeNovix Inc, USA).

2.7.8 Secuenciación de ácidos nucleicos

La identidad de las secuencias de DNA se realizó por secuenciación de ácidos nucleicos utilizando el servicio de secuenciación de MacroGen Inc. (<https://dna.macrogen.com/>).

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa de alineamiento múltiple Clustal Omega utilizando las bases de datos TriTrypDB o GenBank. La calidad de la secuenciación de los genes se corroboró a partir de sus respectivos cromatogramas.

2.8 Generación de cultivos transgénicos

2.8.1 Transformación y selección bacteriana

Se prepararon bacterias *E. coli* DH5 α electrocompetentes de la siguiente manera:

Se creció un cultivo a 37 °C y 300 rpm de agitación hasta la fase exponencial temprana (OD_{600nm} 0.4-0.5). Se recuperaron las células por centrifugación a 3000 xg durante 20 min a 4°C y se lavaron 5 veces en una solución fría y estéril de glicerol al 10% (v/v) con las mismas condiciones de centrifugado. El cultivo se concentró hasta

100 veces en la misma solución de glicerol al 10% (v/v). Se hicieron alícuotas de 100 μ L para almacenar al -80 °C hasta su uso.

Se transformaron bacterias *E. coli* electrocompetentes empleando la técnica de electroporación. Se mezclaron 100 μ L de bacterias con el DNA de la mezcla de ligación o plásmido de interés, se les aplicó el pulso eléctrico utilizando el electroporador *Micropulser Electroporator* (BioRAD, USA) para luego ser recuperadas en medio LB líquido durante 50 min en agitación a 37°C. Posteriormente, las bacterias se sembraron en una placa de LB sólido suplementado con los marcadores de selección correspondientes, ampicilina (100 μ g/ μ L) o cloranfenicol (100 μ g/ μ L) y se incubaron ON a 37 °C.

Las colonias obtenidas se evaluaron por PCR de colonia (*Colony-PCR*) para evaluar la adquisición de la construcción transformada.

2.8.2 Generación de líneas transgénicas de parásitos

2.8.2.1 Transfección de parásitos

Para la generación de líneas transgénicas se utilizaron 10⁸ parásitos/mL en fase de crecimiento exponencial. Los cultivos se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en 350 μ L *buffer* de transfección frío (0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 272 mM sucrosa en PBS, pH 7.2). Se añadieron 40-45 μ g del plásmido en un volumen máximo de 50 μ L a cada suspensión de parásitos y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0.2 cm para incubar en hielo durante 5 min. Los parásitos se electroporaron con un pulso de 400 V y 500 μ F utilizando el equipo Gene Pulser® II (Biorad, USA). La suspensión celular de cada cubeta se recuperó en hielo por 5 min y luego se transfirió a una botella de cultivo con 7 mL de medio LIT suplementado con 20% de SFB e incubados a 28 °C ON. Se procedió luego a seleccionar los cultivos transformados como se explica en los siguientes apartados.

2.8.2.2 Selección de líneas sobre-expresantes

Se transfectaron epimastigotes salvajes o *wild type* (WT) de las cepas CL (Tcl) e Y (Tc-II) con los plásmidos pTREX-TcCAL16xHis, y pTREX vacío (vector sin inserto). Para iniciar el proceso de selección se añadieron concentraciones crecientes de geneticina (G418) (Gibco, USA) desde 24 h post-transfección hasta llegar a una concentración de 500 μ g/mL.

2.8.2.3 Generación de líneas editadas mediante CRISPR/CAS9

La estrategia utilizada para la edición génica del gen *tcca1*, fue la basada en los trabajos de Lander *et al.*, 2015, con algunas modificaciones, según se detalla a continuación.

2.8.2.3.1 Obtención de secuencias de RNA guías específicas para *tcca1*

Se utilizó la herramienta de diseño de guías CRISPR de RNA/DNA para patógenos eucariotas (EuPaGDT-Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool) disponible en la página web: <http://grna.ctegd.uga.edu/>. Se seleccionó la secuencia NGG PAM específica para la enzima CAS9 de *Streptococcus pyogenes* (spCAS9), el genoma de *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like como blanco y la secuencia del gen *tcca1* de *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like extraída de la página web del TriTrypDB. Se seleccionaron dos secuencias de RNA guías (gRNA), que presentaban ausencia de *off-targets* (corte inespecífico) en el genoma, dirigidos a los nucleótidos número 1 y 53 del gen *tcca1*, respectivamente.

2.8.2.3.2 Diseño de oligos, amplificación y clonado de RNA guías

El ARN guía en el sistema CRISPR/Cas9 consta de dos partes: el crRNA, que es la parte "guía" y se une al DNA blanco y el tracrRNA, que actúa como un andamio de unión para la nucleasa Cas9. Las dos moléculas juntas forman el ARN guía (sgRNA), esencial para dirigir la Cas9 a la ubicación correcta en el genoma para la edición.

Para obtener los oligonucleótidos *forward*, FgRNA1 y FgRNA53 (ver tabla 2), las secuencias de los guías gRNA 1 y 53 se añadieron a la secuencia: 5'-GATCGGATCCG-(sgRNA1 o sgRNA53)-GTTTGTAGAGCTAGAAATAGC-3' que corresponde al crRNA, contiene un sitio de corte para la enzima de restricción BamHI (secuencia subrayada) y los 20 nucleótidos que hibridan con la secuencia blanco. Se utilizó el oligonucleótido *reverse* RpUC, (ver tabla 2) con un sitio de corte para la enzima BamHI que forma parte del tracrRNA e hibrida en la región HX1 del plásmido pUC_gRNA.

Cada gRNA (1 y 53), se amplificó mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos *forward* FgRNA1, FgRNA53 y el *reverse* RpUC descritos anteriormente y el plásmido pUC_gRNA como DNA molde. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa y se purificaron como se indica en la sección 2.7.3.

Los fragmentos que codifican para los sgRNAs 1 o 53, se clonaron en el vector pTREX-n/CAS9, previamente digeridos con la enzima BamHI. Se corroboró la identidad de la construcción por secuenciación, utilizando el oligonucleótido HX1 y el servicio de secuenciación de MacroGen.

2.8.2.3.3 Producción de DNA donador

Para favorecer la reparación del corte por la enzima CAS9, se generó un *cassette* de recombinación compuesto por el gen de resistencia a blasticidina (Bsd) flanqueado por 100 pb en cada extremo, correspondientes a fragmentos de las regiones 5' y 3' UTR del gen *tcca1*. Se realizó la búsqueda de las secuencias UTRs del gen *tcca1*, empleando la herramienta de extracción de secuencias en la página web TriTrypDB, seleccionando 100 nucleótidos aguas arriba del codón ATG de inicio (HR1) y 100 nucleótidos aguas abajo del codón *stop* del gen (HR2). La secuencia HR1 fusionada a 20 nucleótidos del inicio del gen de resistencia a Bsd constituyeron el ultrámero 1 y el reverso complementario de la región HR2 con 20 nucleótidos finales del gen de resistencia a Bsd formaron el ultrámero 2, ambos descritos en la tabla 2. Empleando los ultrámeros diseñados y el vector pGEMT/Bsd como molde, se amplificó mediante PCR el *cassette* de recombinación preparando reacciones de PCR hasta alcanzar 1000 µL de producto de PCR. El producto de amplificación se purificó a partir de gel de agarosa como se describe en la sección 6.3.

2.8.2.3.4 Transfección y selección clonal de parásitos

Se co-transfectaron 8×10^7 epimastigotes WT de las cepas Y (TcII) y CL (TcI) con 40 µg de DNA del *cassette* de homología 5'UTR-*bsd*-3'UTR y los plásmidos recombinantes pTREX-n/Cas9/sgRNA1, pTREX-n/Cas9/sgRNA53 o pTREX-n/Cas9/*scrambled*sgRNA, siguiendo las condiciones mencionadas en el punto 2.8.2.1. Los epimastigotes se seleccionaron utilizando concentraciones crecientes de G418 y BSD durante 4 semanas, hasta llegar a una concentración de 500 µg/mL y 15 µg/mL, respectivamente. Seguidamente, los cultivos seleccionados se sometieron a selección clonal en placas de 96 pocillos con una cuña de agar sangre. Para esto, los parásitos se contaron por triplicado en una cámara de Neubauer y se diluyeron en medio LIT hasta obtener 2000 parásitos en la primera columna de la placa. Luego, se hicieron diluciones seriadas al medio ($\frac{1}{2}$) hasta obtener 0.5 parásitos por pocillo en la última columna de la placa de 96 pocillos. Los parásitos se incubaron hasta 3 semanas hasta observar crecimiento de los

clones. Cuando los cultivos alcanzaron densidades de aproximadamente 10^7 parásitos/mL se hicieron pasajes a una placa de cultivo celular de 6 pocillos y posteriormente se expandieron en botellas de cultivo T25.

Los cultivos y clones obtenidos fueron analizados mediante *western blot* y *colony PCR* de parásitos. Las amplificaciones fueron realizadas con oligonucleótidos dirigidos al inicio del gen *tcca1* (CAL3), a la región 3'UTR del gen *tcca1* (P2), a una secuencia aguas arriba del gen *tcca1* (P4) y una región interna del gen Bsd (P3).

2.8.3 Transformación de levaduras

2.8.3.1 Preparación de levaduras electrocompetentes

Se prepararon levaduras cepa L40 electrocompetentes de la siguiente manera: Se inocularon 100 mL de medio YPAD con un preinóculo de *S. cerevisiae* L40 crecido ON y se crecieron a 30 °C hasta obtener una densidad de 1×10^8 células/mL para luego incubar en un baño agua-hielo durante 20 min con el fin de detener el crecimiento. Las células se precipitaron por centrifugación y se hicieron lavados con 100 mL de agua estéril cada uno. El precipitado conteniendo las células se lavó dos veces con 4 mL de 1 M sorbitol y finalmente se resuspendió en 0.1 mL de 1M sorbitol. La suspensión se mantuvo en hielo hasta la electroporación de las células. Todas las centrifugaciones se realizaron a 3000 *xg* por 5 min a 4 °C.

2.8.3.2 Transformación de levaduras a pequeña escala

Se añadieron de 5 a 100 ng de DNA (en un volumen máximo de 5 μ L) a 40 μ L de levaduras L40 electrocompetentes. Se homogeneizó suavemente e incubó 5 min en hielo. Se transfirió la muestra a una cubeta de electroporación de 2 mm previamente enfriada en hielo. Se electroporó utilizando el programa Sc2 del equipo Micropulser Electroporator (BioRAD, USA). Se removió la cubeta de la cámara y se agregó 1 mL de 1 M de sorbitol frío. Se transfirieron las células a un tubo estéril y se plaquearon 100 μ L de células por placa de SD agar con los marcadores de selección correspondientes. Se observó la presencia de colonias a partir de las 48 a 72 h post-transformación.

2.8.3.3 Transformación de levaduras a gran escala

Se partió de levaduras L40 transformadas con el vector recombinante pBTM116/*tcca1*6*his* (L40/TcCAL1) y seleccionadas en placas de agar SD^{-WUK}. Se creció un cultivo de 5 mL de L40/TcCAL1 en medio SD^{-WUK} durante 12 h. La selección con uracilo se utilizó para mantener el gen reportero *his3*.

Se inocularon 50 mL del mismo medio tal que la dilución resultante del cultivo original crezca toda la noche a 30°C hasta una DO_{600nm} entre 1 y 4.

El cultivo saturado se diluyó hasta una DO_{600nm} de 0.3 en 250 mL de medio YPAD y se dejó crecer en agitación a 30°C durante 4 h. Las levaduras se cosecharon por centrifugación a 1500 xg por 5 min a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con 250 mL de acetato de litio (LiAc) 1X, TE 0.5X y se volvió a centrifugar. El precipitado se resuspendió en 5 mL de LiAc 1X, TE 0.5X y se transfirió a un Erlenmeyer de 500 mL. Se le agregó una mezcla de DNA compuesta por 150 µg de la biblioteca de cDNA de *T. cruzi* en pVP16 y 2.5 µg de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. Se mezcló con un agregado de 35 mL de PEG-LiAc y se incubó con agitación por 30 min a 30 °C. Se mezcló con 4.4 mL de DMSO y se incubó a 42 °C por 6 min (*shock* de calor) agitando ocasionalmente para permitir una temperatura homogénea. La mezcla de transformación se diluyó con 100 mL de YPA, para luego enfriar rápidamente hasta temperatura ambiente en baño de agua-hielo. Las levaduras se lavaron con 125 mL de YPA por centrifugación y el precipitado se resuspendió en 250 mL de YPAD para luego incubar con agitación suave por 1 h a 30 °C. El cultivo se centrifugó a 1500 xg por 5 min y el precipitado se lavó con 125 mL de SD^{-WULK}. Las levaduras se centrifugaron nuevamente a 1500 xg por 5 min a temperatura ambiente y el precipitado se resuspendió en 250 mL de SD^{-WULK} para luego incubar con agitación ON. El cultivo se lavó 2 veces con 125 mL de SD^{-WULK} y el precipitado final se resuspendió en 7.5 mL de SD^{-WULK}. Se sembraron 15 placas de 150 mm de diámetro conteniendo agar SD^{-WULK} con 0.5 mL de suspensión de cultivo cada una. Se observaron colonias a partir de las 48 h. Se recuperaron colonias para el ensayo de β-galactosidasa hasta 4 días post siembra.

2.9 Ensayo de doble híbrido

2.9.1 Sistema de doble híbrido en Levaduras

La técnica de doble híbrido en levaduras se basa en el uso de factores de transcripción con organización modular, es decir, que contienen un dominio de unión al DNA y un dominio de activación que son unidades funcionalmente separables. Esta técnica permite la identificación de nuevos socios de interacción de una proteína conocida con proteínas de una biblioteca de cDNA. La estrategia utiliza construcciones formadas por la proteína de interés fusionada al dominio de unión a DNA (BD o *binding domain*) y una biblioteca de cDNA fusionada al dominio de activación (AD o *activation domain*) de un factor de transcripción. Las proteínas de la

biblioteca de cDNA que interactúan con la proteína de interés permiten el ensamblaje del factor de transcripción funcional que se une al DNA y permite la transcripción de un gen reportero que puede ser detectado o medido en un medio de cultivo apropiado. En este caso, se expresó la secuencia de *tccal1* fusionada a la secuencia completa del represor *LexA*, que contiene el dominio BD, mientras que los genes de una biblioteca de cDNA de epimastigotes de *T. cruzi* se fusionaron a la secuencia AD del factor de transcripción del virus del herpes simple (VP16). Las construcciones se expresaron en vectores de alto número de copias, pBTM116 y pVP16, respectivamente. Los vectores recombinantes se utilizaron para transformar levaduras *S. cerevisiae* de la cepa L40, la cual tiene dos genes reporteros, el gen *his3* de levaduras y el gen bacteriano *LacZ*. El factor de transcripción híbrido activa la transcripción de los genes *his3* y *lacZ* permitiendo que las levaduras crezcan en medio sin histidina (H) y tornándose en colonias azules al ensayar la actividad β -galactosidasa (β -gal, apartado 2.9.6).

2.9.2 Vectores de expresión de levaduras utilizados

-pBTM116: El plásmido tiene el gen *trp1* que permite seleccionar levaduras en ausencia de triptófano (W).

-pVP16: El plásmido también contiene el gen *Leu* que permite la selección de levaduras transformadas con este plásmido en medio sin leucina (L).

2.9.3 Clonado de *tccal1* en el vector pBTM116

A partir de DNA genómico de *T. cruzi* se amplificó por PCR la secuencia completa de *tccal1* con los oligonucleótidos específicos CALBTM1 y CALBTM2. El fragmento amplificado y el vector pBMT116 se digirieron con las enzimas *Sma*I y *Pst*I y se purificaron como se describe en la sección 2.7.3. Se llevaron a cabo reacciones de ligación conteniendo el fragmento que codifica para *tccal1x6his* y el vector pBMT116. Se transformaron bacterias y se obtuvo el vector recombinante pBMT116/*tccal1x6his* a partir de mini preparaciones de DNA plasmídico. La construcción pBMT116/*tccal1x6his* se utilizó para transfectar levaduras de la cepa L40 electrocompetentes, como se especificó en 2.8.3.2 y se seleccionaron en placas con medio SD-WUK.

2.9.4 Control de autoactivación y tratamiento con 3-Amino-1,2,4-Triazol

Se transfectaron levaduras L40 pBMT116/*tccal1x6his* (L40/TcCAL1-LexA) con el vector pVP16 sin inserto. Se crecieron en placas de agar SD-WUKL, con las cuales se puede seleccionar levaduras con ambos plásmidos incorporados (clones

pBTM116/*tccal1x6his*–pVP16). El plásmido pMBT116/*lamina* se utilizó como control negativo. Este plásmido contiene la región codificante correspondiente a los aminoácidos 66-230 de la lamina C, insertada en el MCS de pBTM116 que por trabajos previos en el laboratorio se conoce que no activa la transcripción de los genes reporteros *his3*/lacZ. Se estriaron clones conteniendo cada una de las construcciones en placas de agar SD-WUKL y SD-WHULK y se incubaron a 30 °C por 48 h. Las levaduras conteniendo el constructo pMBT116/*lamina* pueden crecer en las placas de agar SD-WUKL pero no en las SD-WHULK dado que la proteína de fusión LexA-lamina no interactúa con el dominio de transactivación VP16 con lo cual no hay transcripción del gen *his3*. En cuanto a los clones pBTM116/*tccal1x6his*–pVP16, pueden crecer en medio SD-WUKL pero no en SD-WHULK. De no ser así, es indicativo de que la fusión TcCAL1-LexA puede reconstituir *per se* el factor de transcripción híbrido con VP16.

Para determinar la concentración mínima del inhibidor 3-Amino-1,2,4-Triazol (3AT) que permite recuperar la auxotrofia a histidina, levaduras recombinantes L40/TcCAL1-LexA se crecieron en placas SD-WUK y SD-WHUK en presencia de 0, 1, 5, 10, 25 y 50 mM de dicho compuesto. Se monitoreó el crecimiento de colonias a los 2, 5 y 7 días post-estriado.

2.9.5 Transformación y selección de clones positivos

Las levaduras L40/TcCAL1-LexA se transformaron con 30 µg de una biblioteca de cDNA construida en el vector pV16 a partir de RNA total de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa CL Brener, siguiendo el protocolo descrito previamente en (Gómez *et al.*, 2001) con las modificaciones detalladas en el apartado 2.8.3.3.

Las levaduras transformadas se seleccionaron en ausencia de histidina (placas SD-WHULK) y los clones obtenidos se repicaron y se mantuvieron hasta medir la actividad β-galactosidasa.

2.9.6 Medición de actividad β-galactosidasa

Se midió la actividad de β-gal de los clones de levaduras obtenidos en el punto 2.9.5 transfiriéndolas a filtros de nitrocelulosa. Las membranas se colocaron, colonias hacia arriba, sobre un soporte de aluminio y se incubaron durante 15 min a -70°C. Los filtros se ubicaron, también con las colonias hacia arriba, sobre papel Whatman 3MM (W3M) y se dejaron descongelar a temperatura ambiente. Luego, se pusieron dentro de la tapa de una caja de Petri (10 cm de diámetro) sobre papel W3M humedecido

con 3 mL de *Buffer Z* con X-Gal. La caja se tapó y se incubó a 30 °C por distintos tiempos y se registró la aparición o no de coloración azul.

2.9.7 Obtención de secuencias de clones positivos

Se obtuvieron las secuencias por realizando colony PCR de levaduras utilizando los oligonucleótidos pVP16F y pVP16R. Los amplificados se purificaron a partir de gel como se describe en el punto 2.7.3 y se enviaron a secuenciar utilizando el servicio de Macrogen.

2.9.8 Control de interacción específica

Para descartar falsos positivos se realizó un control de interacciones específicas. Este ensayo consiste en determinar si las proteínas recombinantes expresadas por los clones positivos (proteínas de unión a TcCAL1) son capaces de asociarse a cualquier proteína inespecífica (fragmento de lamina C) y activar el sistema, o si preferentemente interactúan con TcCAL1. Los clones conteniendo los interactores de TcCAL1 (L40/TcCAL1-LexA/pVP16-*interactor*) se repicaron 4 veces sucesivamente en placas de agar SD-UHLK en presencia de W, para inducir la pérdida del plásmido recombinante pBTM116/*tccal1x6his*. La ausencia del plásmido se corroboró creciendo las levaduras en ausencia de W. Las levaduras L40 pVP16-*interactor* se transformaron con el plásmido pBTM116/*lamina* y se crecieron en placas de agar SD-WHULK, para analizar la capacidad de crecimiento en medio sin H, en placas control de SD completo, SD-WUK, SD-LUK y SD-WLUK. También se realizó el ensayo de actividad β -gal.

2.10 Técnicas de obtención, análisis y procesamiento de proteínas

2.10.1 Obtención de extractos de proteínas

2.10.1.1 A partir de bacterias a pequeña escala

Se partió de precipitados de 10 mL de cultivos de *E. coli* BL21 Rosetta pET22b/*tccalx6his* crecidos en medio LB líquido con 100 μ g/ μ L ampicilina a 37 °C en agitación (300 rpm) ON e inducidos con 1 mM de IPTG. El precipitado se resuspendió en *buffer* de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8 e inhibidores de proteasas cOmplete™ mini protean, Roche). La suspensión se sonicó 5 veces en frío con pulsos de intensidad 5 con el procesador ultrasónico Sonicator® W-385 y se centrifugó para separar las fracciones solubles e insolubles a 12000 *xg* por 10 min a 4 °C. las muestras, precipitado y sobrenadante, se colocaron en tubos separados y se les añadió *buffer* de muestra 4X. Para evaluar la presencia de la proteína en las distintas

fracciones, las muestras se separaron por electroforesis *SDS-PAGE* en gel de poliacrilamida al 12% y se analizaron *por western blot*.

2.10.1.2 A partir de bacterias a gran escala

A partir de 1 L de cultivo bacteriano inducido se obtuvo un precipitado por centrifugación a 10000 *xg* durante 20 min a 4 °C. Se resuspendió en 10 mL de *buffer* de lisis/unión (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8 y *cocktail* de inhibidores de proteasas cOmplete™ mini protease de Roche) y se incubó durante 30 min en hielo con lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y DNAasa (10 µg/mL) en presencia de 5 mM de MgCl₂. La suspensión se sometió a 7 pulsos de 10 seg de intensidad 7 con el procesador ultrasónico Sonicator® W-385 entre cada pulso la muestra se incubó por 10 seg en hielo. El lisado obtenido fue centrifugado a 23000 *xg* durante 30 min a 4°C. El lisado clarificado resultante se reservó a -20 °C para la posterior purificación de TcCAL1x6His (2.14.2).

2.10.1.3 A partir de levaduras

Los extractos proteicos de levaduras se obtuvieron a partir de precipitados de cultivos crecidos hasta 1-2 x10⁷ células/mL, recuperados por centrifugación a 2000 *xg* por 5 min. Cada 1 mL de cultivo se resuspendió en 200 µL de PBS 1X y NP40 0.5%. Se agregó el volumen correspondiente de *buffer* de siembra 4X y se calentaron las muestras por 5 min a 100 °C.

2.10.1.4 A partir de parásitos

Se partió de precipitados correspondientes a 1-4 x 10⁷ de epimastigotes, amastigotes axénicos y tripomastigotes metacíclicos o derivados de células. Se lavaron de 1 a 3 veces con un volumen de PBS cada uno y se colectaron por centrifugación durante 5 min a 3000 *xg*. Los precipitados resultantes se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Para obtener los extractos de proteína total, el precipitado de parásitos se resuspendió en *buffer* de lisis conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 14 mM β-mercaptoetanol, suplementado con un *cocktail* de inhibidores de proteasas (cOmplete™ Roche, cat. 11836153001, Suiza). Luego se realizaron 6 ciclos de congelado y descongelado en N₂ líquido y agua a temperatura ambiente, respectivamente. La suspensión obtenida se centrifugó por 10 min a 4000 *xg* a 4°C. El sobrenadante resultante, extracto proteico soluble, se reservó a -20 °C para ensayos de verificación de la expresión de TcCAL1 endógena o recombinante, así

como la disminución de la expresión de TcCAL1 endógena en parásitos sometidos a edición génica por CRISPR/CAS9.

Para obtener fracciones microsomales y solubles, los extractos proteicos de epimastigotes se centrifugaron durante 20 min a 3000 $\times g$ a 4 °C. Las fracciones resultantes, precipitados (fracción microsomal) y sobrenadantes (fracción soluble), se separaron en tubos diferentes y se les añadió *buffer* de siembra 4X. Para evaluar la presencia de la proteína en las distintas fracciones, las muestras se separaron por electroforesis *SDS-PAGE* en gel de poliacrilamida al 12% y se analizaron por *western blot*.

2.11 Cuantificación de proteínas

En una placa de 96 pocillos se colocaron 10 μ L de diferentes diluciones de los extractos proteicos y 200 μ L de reactivo de Bradford. La curva estándar se realizó en base a 5 puntos de masa creciente de seroalbúmina bovina (BSA). Se midió la absorbancia a 595 nm de todas las muestras en un lector de microplacas VERSAmax® (Molecular Devices Corporation, UK). Con los valores de absorbancia medida de los estándares de proteína conocida se construyó una curva de calibración. Esta curva muestra la relación entre la absorbancia y la concentración de proteínas. La concentración de las muestras se obtuvo extrapolando desde la curva de calibración el valor correspondiente de concentración (Bradford, 1976; Kielkopf *et al.* 2020).

2.12 Electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida (*SDS-PAGE*)

Entre 25-45 μ g de proteína total de extractos de *T. cruzi* o 20 μ g de proteínas totales de extractos con proteína recombinante, fueron mezclados con *buffer* de siembra para proteínas 4x (0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 10% (m/v) SDS, 0.008% (v/v) Azul de bromofenol, 40% (v/v) Glicerol, 0.4 M DTT ó 20% (v/v) β -mercaptoetanol), incubados a 98 °C por 5 min y sembrados en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes. La corrida electroforética se realizó en *buffer* Tris-glicina con SDS al 0,1% (m/v) en una cámara de corrida Mini-PROTEAN® tetra system (Bio-Rad, USA) a voltaje constante de 100 V por gel.

2.13 Western blot

Las proteínas separadas por *SDS-PAGE* fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, USA) a una corriente constante de 95 mA para geles completos. Las membranas se bloquearon en solución de bloqueo (5% m/v) leche

descremada en PBS) durante 1 h. La solución de bloqueo se descartó y se incubó con el anticuerpo primario en solución de incubación (2% m/v) leche descremada en PBS) durante toda la noche a 4 °C. Luego, se realizaron 4 lavados de 5 min cada uno con PBS-Tween 20 (PBS, 0.001% v/v) Tween 20) para después incubar con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (HRP) (diluciones en solución de incubación) durante 1 h:30 min a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-Tween 20. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación constante. Finalmente, el revelado se realizó incubando las membranas con solución de Pierce™ ECL *Western blotting* substrate (Thermo Scientific, USA) según las especificaciones del ensayo. Las imágenes se obtuvieron exponiendo las membranas en el detector de quimioluminiscencia GeneGnome y el software de adquisición de imágenes GeneSys siguiendo las instrucciones del fabricante (Syngene inc., USA).

2.14 Producción de TcCAL1x6His recombinante

2.14.1 Inducción de la expresión de TcCAL1x6His a partir de bacterias

Se creció un cultivo de *E. coli* BL21 Rosetta pET22b/*tccal1x6His* a 37 °C en agitación ON para inocular 1L de LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina en una dilución 1/50. El litro de cultivo se creció hasta una OD_{600nm} = 0.4-0.5 y se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína. A las 4 h de crecimiento se obtuvo un precipitado por centrifugación a 10000 xg durante 20 min a 4 °C. El precipitado bacteriano se almacenó a -70 °C hasta la purificación.

2.14.2 Purificación de TcCAL1x6His a partir de bacterias

Para purificar la proteína, se empaquetaron 3 mL de una suspensión al 50% de resina Ni-NTA (Qiagen®, USA) y se equilibró con 7 volúmenes de *buffer* de lisis/unión frío. El lisado clarificado obtenido como se describe en el apartado 2.10.1.2, se transvasó a un tubo con la resina equilibrada y se incubó durante 1 h a 4°C en un rotador para mantener el contacto resina-lisado.

Luego de la incubación, la suspensión resina-lisado se transfirió a una columna y se dejó empaquetar. Se recuperó el percolado y se realizaron lavados de 1 mL con *buffer* de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl y 20 mM imidazol, pH 8) hasta que la Abs_{280nm} estuvo por debajo de 0.04. Los eluidos se realizaron con 7 mL de *buffer* de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl y 250 mM imidazol, pH 8) y se colectaron en fracciones de 700 µL cada una. Se midió Abs_{280nm} para monitorear la elución de la

proteína. Las fracciones con mayor concentración de proteína se reunieron en un solo tubo y se trataron según la necesidad de los ensayos posteriores.

2.15 Tratamiento reductor con β -mercaptoetanol

Dado que la proteína TcCAL1x6His purificada de *E. coli* se obtuvo en forma de dímeros y monómeros se sometió a un tratamiento con β -mercaptoetanol para obtener una muestra 98 % monomérica aplicando el siguiente tratamiento:

Se determinó la concentración de la proteína obtenida de la purificación por afinidad con la resina de níquel agarosa por el método de Bradford. La muestra se trató con 5% (v/v) de β -mercaptoetanol por cada 1 mg de proteína total estimada. La solución se incubó durante 15 min a 45 °C y 15 min adicionales a temperatura ambiente. La solución de la proteína tratada con β -mercaptoetanol, se sometió a diálisis en una membrana de diálisis (Spectrum con cut-off= 6-8 kDa) contra 1.5 L de *buffer* de diálisis (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl a pH 8). El proceso se realizó a 4 °C en agitación suave con 2 cambios de *buffer* cada 8 h.

2.16 Tratamiento con resina Chelex® 100.

La proteína obtenida de la purificación, tratada con β -mercaptoetanol y dializada se trató con resina Chelex® (Sigma, USA. Cat 7901) para quelar los cationes divalentes presentes en la muestra. El tratamiento se realizó incubando 0.5 g de resina por cada 10 mL de proteína a 4 °C en agitación. La muestra se separó de la resina pasando la mezcla resina-proteína por una columna de plástico PD-10.

2.17 Concentración de la proteína TcCAL1x6His

Se utilizaron tubos concentradores Macrosep® Advance con cut-off 3K (Pall Corporation, USA). La muestra de proteína recuperada de diálisis y sometida a tratamiento con Chelex® fue trasvasada al tubo concentrador y centrifugada a 3000 *xg* en lapsos de 5 min para monitorear el volumen de muestra. La concentración deseada de TcCAL1x6His se alcanzó recuperando la muestra de los tubos concentradores. Cuando no se alcanzó la concentración deseada con los tubos concentradores, se realizó un paso adicional de concentración por vacío con un *speed vaccum*.

2.18 Producción de suero policlonal anti-TcCAL1x6His

Se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c por vía intraperitoneal, siguiendo un esquema de inmunización de tres dosis a intervalos de 15-20 días. Las dosis fueron compuestas por 10 μ g de proteína recombinante TcCAL1x6His con adyuvante de Freund completo, y 2 μ g de proteína recombinante con adyuvante de Freund incompleto en las

dos últimas dosis. Una vez pasados 15-20 días de la tercera dosis, se extrajo la sangre de los ratones. Los sueros fueron obtenidos por incubación de la sangre a 37 °C durante 1 h para favorecer la formación del coágulo. Luego, se centrifugaron a 3000 xg durante 20-30 min, el suero fue recolectado y conservado a -20°C. También, se procesó suero de ratones antes de inmunizar para obtener suero pre-inmune control.

2.19 Técnicas analíticas de proteínas

2.19.1 Determinación de unión a Ca^{2+} por TcCAL1x6His

Para los análisis de unión a calcio por dicroísmo circular (CD) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se utilizó el servicio ofrecido por la Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabólica (plaBEM-CONICET) del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario.

La proteína recombinante TcCAL1x6His se purificó y se trató con β -mercaptoetanol y resina Chelex® (apartados 2.14, 2.15 y 2.16) y se utilizó para los ensayos de CD y RMN de la siguiente manera:

2.19.2 Dicroísmo circular (CD)

Se emplearon muestras de TcCAL1x6His con una concentración de 130 a 220 μM . Luego, se añadió 10 mM CaCl_2 o 100 mM EGTA para obtener muestras en exceso o ausencia de Ca^{2+} , respectivamente. Se utilizó un espectropolarímetro UV-Vis marca JASCO modelo J-1500 y una cubeta de cuarzo de paso óptico de 1mm o 10mm, para adquirir espectros de UV cercano o lejano, respectivamente. Para la espectroscopía de UV cercano, se adquirieron espectros de dicroísmo circular entre 250 y 320 nm, correspondiente a la región de absorción de los aminoácidos aromáticos. Las concentraciones de las soluciones utilizadas se estimaron adquiriendo espectros de absorción UV y calculando a partir de la Abs280. Para la espectroscopia de UV lejano, se adquirieron espectros de dicroísmo circular entre 190 y 240 nm, correspondiente a la región de absorción de los enlaces que componen el plano peptídico. En este caso, las muestras se llevaron a una concentración 0.15 mg/mL usando agua milliQ producida en nuestro laboratorio.

2.19.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se emplearon muestras de TcCAL1x6His con una concentración de 400 a 500 μM , a las que se añadió 10 mM CaCl_2 o 100 mM EGTA para obtener la proteína en exceso o ausencia de Ca^{2+} , respectivamente. Para el análisis, se utilizó un espectrómetro de RMN marca Bruker operando a una frecuencia de ^1H de 400 MHz, a una temperatura regulada de 24 °C. Las secuencias de pulsos y adquisición de

espectros se controlaron con una consola Avance III. Se adquirieron espectros mono-dimensionales ^1H -1D de las muestras con supresión de agua en un rango de -2 a 12 ppm, utilizando la secuencia de pulsos *zgesgp* del catálogo de programas de Bruker. Las condiciones de adquisición fueron $\text{O1P} = 4,70$ ppm, $\text{SW} = 16$ ppm, $\text{TD} = 9384$, $\text{NS} = 512$, $\text{RG} = 203$ con un tiempo total de adquisición de 15 min para cada muestra. Los *buffers* se adquirieron con $\text{NS} = 128$ durante 4 min. El pulso de ^1H fue calibrado utilizando el macro pulsecal.

2.19.4 Ensayo de unión de Ca^{2+} con el indicador Quin-2

La determinación de unión a calcio por TcCAL1x6His se realizó con base en el protocolo de Tatsumi *et al.*, 1997 con ligeras modificaciones. Las proteínas fueron inmovilizadas en una membrana de PVDF utilizando un equipo de dot blot. Se dejaron secar completamente y se incubaron con una solución conteniendo 60 mM KCl, 5 mM MgCl_2 y 10 mM de Imidazol a pH 6.8 durante 1 h en agitación realizando 2 cambios de la solución. Luego, la membrana se incubó en la misma solución conteniendo 1 mM CaCl_2 en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavó tres veces en una solución de etanol al 20% (v/v) durante 5 min cada lavado y con agua milliQ tres veces con cambios cada 5 min. Posteriormente, la membrana se incubó con una solución de 1 mM de Quin-2 (cat. 4750-Sigma, USA) durante 12 h en agitación y en oscuridad. Finalmente, la membrana se lavó 3 veces con agua milliQ y se dejó secar completamente sobre papel filtro en oscuridad. Para evidenciar la unión calcio se evaluó la fluorescencia de cada *spot* de proteína irradiando con luz UV en un transiluminador. Las proteínas BSA, calmodulina y sorcina se utilizaron como controles positivos. Como controles negativos se usaron lisozima e invertasa.

2.20 Análisis de modificaciones postraduccionales

2.20.1 Ensayo de palmitoilación de TcCAL1x6His: Intercambio acil-biotina (AB)

Se realizó la determinación de palmitoilación de TcCAL1 según el protocolo descrito por Wan *et al.*, (2007) con algunas modificaciones y en colaboración con la Dra. María Corvi (INTECH-Chascomus). Se partió de un precipitado de epimastigotes de la cepa CL WT. Cada muestra de parásitos precipitados equivalente a 5 mg de proteína estimada se resuspendieron en 4 mL de *buffer* de lisis que contenía 10 mM de N-etilmaleimida (NEM) y se sometieron a sonicación con ciclos de 15 seg de sonicación y 15 seg de descanso durante 10 períodos. Luego, la concentración de

NEM se ajustó a 2 mM. Seguidamente se aplicó el protocolo de intercambio acil-biotina (ABE) (Wan *et al.*, 2007), que consta de tres pasos principales:

1) Bloqueo de grupos tioles libres (R-SH) con NEM, 2) Tratamiento con hidroxilamina (HA) para liberar los grupos palmitoilos de cisteínas que estaban modificadas por palmitoilación, generando nuevos grupos tiol (R-SH) y 3) Biotinilación de grupos tioles (recién liberados de ácido palmítico) y posterior purificación por una resina de agarosa acoplada a estreptavidina. La detección de TcCAL1 en la muestra proteica obtenida luego del pasaje del lisado de epimastigotes por la resina agarosa-estreptavidina se realizó con el anticuerpo anti-TcCAL1x6His.

Como control se usó el mismo lisado de epimastigotes CL WT el cual no se trató con HA (control -HA) con el fin de obtener una muestra sin liberación de los grupos de ácido palmítico y en consecuencia proteínas que no serían biotiniladas ni purificadas. La detección de TcCAL1 en la fracción -HA indicaría inespecificidad en la biotinilación y unión a la resina agarosa-estreptavidina.

2.21 Determinación de niveles de Ca^{2+} intracelular en epimastigotes

Para realizar cuantificación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en epimastigotes se siguió el protocolo descrito por Rey-Cibati *et al.*, (2020), con algunas modificaciones. Brevemente, se realizó la incorporación de Fura-2 acetoximetilado (Fura 2-AM) (Cat. F1201-Molecular Probes, USA) en epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y. El Fura 2-AM es un indicador de Ca^{2+} fluorescente que presenta dos longitudes de onda de excitación diferentes cuando se encuentra en su forma libre de Ca^{2+} (380 nm) o unido a Ca^{2+} (340 nm) mientras que, la longitud de onda de emisión es independiente de esa asociación, manteniéndose siempre a 510 nm. Para realizar la incorporación de Fura 2-AM en los parásitos, se colectaron 1×10^7 epimastigotes de un cultivo en fase exponencial por centrifugación a 1500 xg por 3 min, para luego lavarlos 3 veces con *buffer* de carga (116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO_4 , 5.5 mM D-Glucosa, 1.8 mM CaCl_2 , 50 mM HEPES, pH 7.4). El precipitado obtenido se resuspendió en *buffer* de carga suplementado con 2 μM de Fura 2-AM, 0.05 % de ácido plurónico (Cat. P3000MP-Invitrogen, USA) y 2.4 mM de probenecid (Cat. 50027-Biotium, USA). La suspensión se incubó por 1 h y 30 min a 28 °C, en oscuridad y agitación constante (400 rpm). Posteriormente, los parásitos se lavaron 2 veces con *buffer* de carga en ausencia del fluoróforo centrifugando a 1500 xg por 3 min. El precipitado resultante se resuspendió en 500 μL de *buffer* suplementado con 2.4 mM de probenecid y 1% (m/v) de Sacarosa. Esta suspensión se distribuyó en volúmenes de 75 μL en una placa de 96 pocillos y se incubó durante 80 seg. En este

punto se añadió 30 µM digitonina y luego, a los 120 seg, 0.3% (v/v) tritón X-100 con el objetivo de elevar el calcio intracelular y obtener el máximo valor de fluorescencia. A los 160 seg de lectura, se agregó 100 mM EGTA como quelante de calcio para obtener el menor valor de fluorescencia del sistema. Se realizaron lecturas a las longitudes de onda de excitación y emisión mencionadas, utilizando un espectrofluorímetro robotizado multiplaca FlexStation® 3 (Molecular devices, USA), configurado a 28 °C. Las concentraciones de Ca²⁺ basal se obtuvieron a través de la relación de proporcionalidad de emisión de fluorescencia con la concentración de Ca²⁺ propuesta por Grynkiewicz et. al 1985. Mediante la ecuación:

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{F_{min}}{F_{max}}$$

Donde, K_d es la constante de afinidad del compuesto Fura 2-AM por el ion Ca²⁺ (224 nm), R_{min} el menor valor de la relación de las fluorescencias de excitación 340 nm/380 nm en ausencia de Ca²⁺ (después de añadir el quelante de Ca²⁺ EGTA), R_{max} el mayor valor de la relación de las fluorescencias de excitación 340 nm/380 nm en una condición de exceso de Ca²⁺ (después de añadir tritón X-100), F_{min} es el mayor valor de fluorescencia del Fura 2-AM cuando es excitado a 380 nm luego de añadir EGTA (ausencia de Ca²⁺ extracelular), F_{max} es el menor valor de fluorescencia del Fura-2AM cuando es excitado a 380nm luego de añadir Tritón X-100, el cual permeabiliza la membrana y permite la entrada de Ca²⁺ del exterior celular y permite un incremento de fluorescencia del Fura 2-AM.

2.22 Ensayos biológicos *in vitro*

2.22.1 Localización subcelular por inmunofluorescencia

Se cosecharon 500 µL de parásitos a una densidad de 10⁷ parásitos/mL por centrifugación a 3000 xg durante 5 min. El precipitado se lavó dos veces con PBS y luego se resuspendió en 200 µL del mismo *buffer*. Esta suspensión se incubó durante 8 min en pocillos de láminas portaobjetos tratados previamente con 0.1 mg/mL de poli-L-lisina (cat. P6282- Sigma, USA) para permitir la adhesión de los parásitos. Los pocillos con parásitos adheridos se incubaron con una solución de 4% (m/v) de paraformaldehído (PFA) en PBS durante 30 min para la fijación y luego, se permeabilizaron con una solución de 0.2% (v/v) Tritón X-100 en PBS durante 2 min. El bloqueo de las muestras se realizó en solución de bloqueo (2% m/v BSA en PBS) durante 60 min. Los parásitos se incubaron con el anticuerpo primario ON a 4 °C y con el anticuerpo secundario durante 60 min a temperatura ambiente diluidos en

solución de bloqueo, con lavados intermedios con PBS 1X. Finalmente, para teñir los ácidos nucleicos los parásitos se incubaron con solución de DAPI (1 mg/mL) durante 4 min. El montaje de la preparación se realizó con la solución comercial Vectashield® (Vector Laboratories, USA). Las láminas se observaron en el microscopio de fluorescencia Olympus BX-61 o en el confocal Carl Zeiss LSM 880 acoplado a un módulo Airyscan con un objetivo de 63X. El análisis y edición de las imágenes obtenidas se realizó con el software FIJI-ImageJ.

2.22.2 Curva de proliferación de epimastigotes

Las curvas de proliferación se construyeron a partir de un número de parásitos inicial de 3×10^5 parásitos/mL. Los parásitos transgénicos, sobreexpresantes de la proteína TcCAL1x6His o sometidos a edición génica mediante CRISPR/CAS9 y sus respectivos controles, se incubaron con el agregado del antibiótico de selección, según cada caso. Los cultivos se crecieron de 10 a 12 días a 28 °C y se realizaron conteos diarios por triplicado en una cámara de Neubauer para construir las curvas de crecimiento.

2.22.3 Metaciclologénesis *in vitro* de epimastigotes

Se utilizaron epimastigotes sobreexpresantes de la proteína TcCAL1x6His y parásitos transfectados con el vector pTREX vacío como control. La diferenciación hacia las formas metacíclicas se realizó por medio de dos protocolos. En primer lugar, se utilizó el medio TAU (por sus siglas en inglés, *Triatomine Artificial Urine*), un medio químicamente definido utilizado para inducir la metaciclologénesis (Contreras *et al.*, 1985). Para esto, un cultivo de epimastigotes de 7 días de crecimiento fue incubado en medio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM de CaCl₂ y 8 mM de *buffer* de fosfato de sodio, pH 6.0) durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, los parásitos recuperados por centrifugación y se resuspendieron en medio TAU-3AAG (TAU suplementado con 50 mM glutamato de sodio, 10 mM de L-prolina, 2 mM de aspartato de sodio y 10 mM glucosa) e incubados durante hasta 72 h 28°C. Cada 24 h, se contaron las formas metacíclicas por triplicado.

Por otro lado, la metaciclologénesis se llevó a cabo inoculando la fase líquida de un tubo de medio BAL en presencia de G418 (500 µg/mL) con 5×10^5 parásitos/mL. Los cultivos fueron incubados a 28 °C y en diferentes tiempos se tomaron muestras para realizar conteos por triplicado en una cámara de Neubauer.

El porcentaje de diferenciación se determinó contando el número de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y utilizando la fórmula:

$$Formas\ MT = \frac{nro.\ de\ MT \times 100}{nro.\ de\ MT + nro.\ de\ E}$$
, donde MT= tripomastigotes metacíclicos y E= epimastigotes.

2.22.4 Aislamiento de tripomastigotes metacíclicos

Para aislar los tripomastigotes metacíclicos de las formas epimastigotes luego de la diferenciación *in vitro* en medio bifásico BAL, los parásitos se sometieron a lisis por el sistema de complemento de la siguiente manera:

El cultivo conteniendo la mezcla de tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes, se centrifugó durante 10 min a 3000 xg. El precipitado se resuspendió en medio RPMI sin suplementos con 80% de SFB sin inactivar y sin irradiar (Natocor, Argentina). La suspensión se incubó durante 40 min a 37 °C para facilitar la lisis por complemento de los epimastigotes. Esto último se verificó observando una alícuota de cultivo en el microscopio óptico (40X). La suspensión resultante compuesta por tripomastigotes metacíclicos y debris celular, se centrifugó a 3000 xg durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 500 µL de RPMI suplementado con 5% de SFB y se centrifugó nuevamente a 3000 xg por 5 min para sedimentar el debris celular. El tubo conteniendo el debris sedimentado y el sobrenadante se incubó a 37 °C por al menos 3 h para promover la natación al sobrenadante de los tripomastigotes metacíclicos atrapados en el debris. Los tripomastigotes metacíclicos se recuperaron transvasando cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo.

2.22.5 Amastigogénesis *in vitro* a partir de tripomastigotes metacíclicos

Se tomaron cultivos con 1×10^7 tripomastigotes metacíclicos diferenciados en medio bifásico (BAL), se centrifugaron a 3000 xg durante 10 min y se lavaron 3 veces con medio MEM pH 7.4 sin suero. Luego, se lavaron dos veces con MEM pH 5, suplementado con 0.4% (m/v) BSA y se resuspendieron en el mismo medio a una concentración final de 1×10^7 parásitos/mL. Los parásitos se incubaron en una placa de 96 pocillos por triplicado durante 4 h a 37 °C y se tomaron muestras para análisis por microscopía. Los parásitos se sembraron en láminas portaobjetos previamente poli-lisinadas y fueron fijados con PFA al 4% (m/v) y permeabilizados con 0.1% (v/v) de Tritón X-100 durante 30 min y 4 min, respectivamente. Cada pocillo fue incubado con DAPI durante 4 min para evidenciar la ubicación del núcleo y kinetoplasto. Finalmente, las láminas fueron montadas en VECTASHIELD® y observadas en un microscopio de fluorescencia Olympus BX-61. Para cada triplicado se tomaron 3 fotos

con al menos 100 parásitos por campo y se contó el porcentaje de formas amastigotes tomando en cuenta la posición relativa del kinetoplasto y el núcleo de la célula.

2.22.6 Adhesión de tripomastigotes metacíclicos a células Vero

Se usaron tripomastigotes metacíclicos aislados, como se describió en el punto 2.22.4. Las células Vero se infectaron en una relación 300:1 parásito: célula hospedadora, de la siguiente manera:

Se sembraron 2×10^4 células Vero en cubreobjetos de vidrio redondos de 13 mm y se incubaron con 6×10^6 tripomastigotes metacíclicos durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con PBS, pipeteando suavemente. Los cubreobjetos se fijaron y se sometieron a tinción con el *kit* Panoptic ColorPack (BioPack, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células teñidas se visualizaron y fotografiaron utilizando un microscopio óptico (40X). Se calcularon los porcentajes de células que contenían parásitos adheridos y el número de parásitos por célula hospedadora, en campos seleccionados al azar. Se contaron un total de 200 células Vero por triplicado. El índice de adhesión se calculó multiplicando el porcentaje de células Vero con parásitos adheridos por el número promedio de parásitos adheridos por cada célula.

2.22.7 Invasión *in vitro* de tripomastigotes metacíclicos a células Vero

Se utilizaron tripomastigotes metacíclicos aislados, como se describió en el apartado 2.22.4.

Se sembraron 2×10^4 células Vero en cubreobjetos de vidrio redondos de 13 mm y se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos durante 24 h en medio RPMI suplementado con SFB al 3%. Posteriormente, los discos de células se infectaron con 6×10^6 tripomastigotes metacíclicos en una relación 300:1 parásito: célula hospedadora y se incubaron en medio RPMI suplementado con SFB al 3% durante 24 h a 37 °C. Luego, los discos de infección se lavaron con PBS hasta no observar parásitos en el medio y se incubaron por 48 h. luego, los discos de infección se fijaron con metanol puro previamente enfriado a -20 °C, se tiñeron con el *kit* Panoptic ColorPack y se observaron bajo microscopio óptico (40X). Se calcularon los porcentajes de células infectadas y el número de amastigotes intracelulares por cada célula hospedadora, en campos seleccionados al azar. En este caso, se contaron 300 células Vero por triplicado. El índice de invasión se determinó multiplicando el porcentaje de células Vero infectadas por el número promedio de amastigotes por cada célula infectada.

Para los ensayos de adhesión e invasión (punto 2.22.6. y 2.22.7) se calculó el *Fold Change* (FC) de los índices obtenidos, mediante la fórmula:

$$FC = \frac{I_{Y-CAL1} - I_{Y-C}}{I_{Y-C}}$$

donde I_{Y-CAL1} o I_{Y-C} se refieren a los índices de adhesión o invasión de las células Vero incubadas con parásitos control conteniendo el vector pTREX vacío(Y-C) o parásitos sobreexpresantes de TcCAL1x6His (Y-CAL1), respectivamente.

2.23 Infección *in vivo* de ratones con tripomastigotes metacíclicos

Se emplearon ratones de la cepa BALB/c que fueron criados y alojados en las instalaciones para animales del Instituto de Microbiología y Medicina Experimental (IMPaM-CONICET, Universidad de Buenos Aires), en colaboración con la Dra. Catalina Alba Soto. Durante el período experimental, los ratones fueron sometidos a condiciones estándar, incluyendo un ciclo de luz de 12 h y oscuridad de 12 h, dentro de una habitación con temperatura controlada (25 ± 2 °C). Se garantizó su acceso libre a comida y agua.

Todos los procedimientos que involucraron a los animales fueron llevados a cabo con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, de acuerdo con las regulaciones institucionales (Aprobación No. RS2079/2007, Universidad de Buenos Aires). Asimismo, estos procedimientos estuvieron en estricta conformidad con las regulaciones gubernamentales establecidas por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), según la resolución No. RS617/2002 en Argentina. También, se implementaron todos los esfuerzos necesarios para reducir al mínimo el número de animales utilizados y para mitigar cualquier posible sufrimiento durante el desarrollo de los experimentos.

Se inocularon 1×10^5 tripomastigotes metacíclicos obtenidos por diferenciación *in vitro* en medio bifásico BAL (ver apartado 2.22.3 y 2.22.4) en ratones vía intraperitoneal. El análisis de la parasitemia se realizó a los 15 y 21 días en cámara de Neubauer con muestras de sangre periférica proveniente de la vena de la cola diluida (1/10) en una solución de lisis de glóbulos rojos (Tris-NH₄Cl 0.83% pH 7.2). El proceso de infección también se llevó a cabo en ratones inmunosuprimidos con dos dosis de ciclofosfamida (200 mg/kg por vía intraperitoneal) cada 4 días.

2.24 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media $\pm$ el error estándar. Para analizar la significancia estadística de los ensayos, se utilizó ANOVA bidireccional o *T-Student*, según se indica en cada caso. Las diferencias se consideraron significativas a * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software).

3. Resultados

PARTE I. Estudios *in silico* de las características de TcCAL1 de *T. cruzi*

Con el objetivo de profundizar el conocimiento de algunas propiedades bioquímicas de TcCAL1, se utilizó un abordaje *in silico* empleando distintas herramientas bioinformáticas. Para esto, se realizó un estudio de las relaciones evolutivas de TcCAL1 con sus ortólogos a través de la construcción de un árbol filogenético. También, se utilizó la secuencia de aminoácidos de la proteína para realizar el modelado tridimensional, estudiar los sitios de unión a Ca^{2+} y predecir sus modificaciones postraduccionales.

3.1 Relaciones filogenéticas de TcCAL1, características de la secuencia aminoacídica y modelado estructural

La proteína TcCAL1 (Nro. de acceso en TriTrypDB: TcCLB.507165.30), tiene 103 aminoácidos, dos motivos putativos de tipo *EF-hand* que abarcan los residuos de aminoácidos del 31 al 97 y un sitio de fosforilación en la serina 4, determinado experimentalmente (Fig. 4 A) (Marchini *et al.*, 2011). El software *AlphaFold*, nos permitió realizar la predicción *Ab initio* del plegamiento tridimensional de la región de TcCAL1 que comprende los motivos *EF-hand* de la proteína. En nuestra predicción, no se encontraron modelos similares, con suficiente confianza para realizar una predicción de estructura secundaria en los 31 primeros aminoácidos. Posteriormente al modelado que se realizó para esta tesis, en el portal TriTrypDB se publicó la predicción de estructura terciaria de algunas proteínas por *AlphaFold*, entre ellas la de TcCAL1. Si bien esta estructura guarda similitud a la obtenida en este trabajo, predice además la existencia de láminas- β en la región N-terminal de la proteína (Fig. 4 B).

La relación evolutiva de TcCAL1 algunos ortólogos en otros tripanosomátidos, se estudió mediante la construcción de un árbol filogenético con las secuencias aminoacídicas de diferentes especies representativas. Se encontraron ortólogos en otras especies del género *Trypanosoma sp.*, en el género *Leishmania sp.* y en el kinetoplástido de vida libre *Bodo saltans*. Las relaciones filogenéticas deducidas se ajustan a las relaciones taxonómicas actuales de kinetoplástidos. Además, en búsquedas mediante BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) en la web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) no se encontraron ortólogos en grupos de organismos no kinetoplástidos (Fig. 4 C).

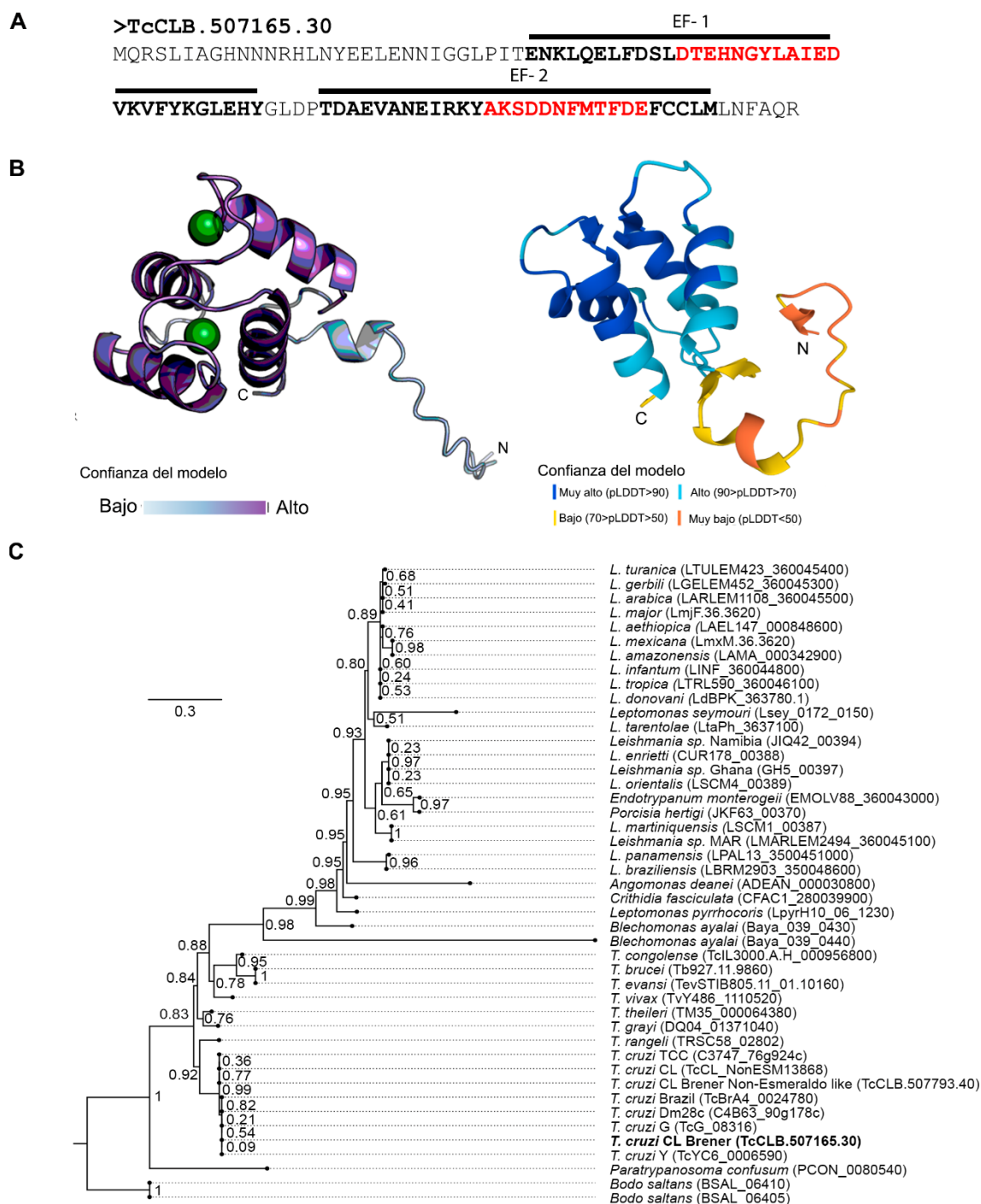


Figura 4. Características de la secuencia aminoacídica, modelado estructural y relaciones filogenéticas de TcCAL1. **A.** Secuencia aminoacídica de TcCAL1 y posición de los motivos *EF-hand*. Las letras en negrita color negro y rojo indican las estructuras de alfa hélices y el bolsillo de unión a Ca^{2+} , respectivamente. **B** Estructura tridimensional de TcCAL1 modelada con *AlphaFold* (izquierda) y modelo disponible en TritypDB (derecha). Las esferas de color verde indican los iones Ca^{2+} . El gradiente de colores en la estructura representa el grado de confianza en la predicción de cada modelo. **C.** Árbol filogenético de las proteínas homólogas a TcCAL1 en diferentes especies de tripanosomátidos. La barra de escala representa 0.3 sustituciones por posición en la secuencia de aminoácidos. El número en las ramas del árbol indican el valor de *Bootstrap*. TcCAL1 de la cepa de referencia CL Bener está resaltada en negrita.

3.2 Análisis de los dominios *EF-hand* de TcCAL1

Además del estudio filogenético, se realizó un estudio más detallado de la región con similitud a los dos motivos *EF-hand* que posee TcCAL1 descritos en la base de datos de TriTrypDB.

Los motivos *EF-hand* han sido ampliamente estudiados y, en secuencias canónicas, se han identificado los aminoácidos responsables de la unión y coordinación del Ca^{2+} . La estructura *EF-hand* es una estructura hélice-bucle-hélice: dos α -hélices unidas por un bucle de 12 aminoácidos que coordina iones Ca^{2+} . Estos últimos, en su mayoría, son aminoácidos cargados negativamente (Glu, Asp) y/o con grupos carbonilo de la cadena principal. Todos estos residuos forman una jaula de geometría de bipirámide pentagonal que coordina el ion Ca^{2+} . Si los aminoácidos del bucle que participan en la unión del catión se representan en una secuencia, ocuparían las posiciones 1, 3, 5, 9 y 12, que desde un punto de vista espacial se pueden representar como los vértices en los ejes X, Y, Z, -X y -Z de una bipirámide pentagonal, respectivamente. Otros aminoácidos conservados en la secuencia del bucle de unión, se encuentran en las posiciones 6, 7 y 8 (Fig. 5 A).

A través de un alineamiento múltiple de TcCAL1 con proteínas que poseen *EF-hand* caracterizados, fue posible identificar los aminoácidos en la proteína que participarían en la unión de Ca^{2+} (Fig. 5 A). Este alineamiento se realizó con secuencias obtenidas de la base de datos del TriTrypDB de proteínas con dominios de unión a Ca^{2+} de *T. cruzi* como: calmodulina, proteína flagelar de unión a Ca^{2+} (*Flagellar CBP*), centrina, calreticulina, calcineurina, caltractina, y además se incluyó la secuencia de la calmodulina humana extraída del GeneBank. Se obtuvo, además, la secuencia *Logo* que hace referencia al grado de conservación de los residuos en cada posición (Fig. 5B). En ésta última, la mayor conservación de los residuos en el alineamiento está relacionada con un mayor tamaño en las letras y viceversa. En líneas generales, el alineamiento muestra la conservación de los aminoácidos de los motivos *EF-hand* entre todas las secuencias analizadas, incluyendo a TcCAL1. Los aminoácidos más importantes del motivo *EF-hand* están indicados con triángulos verdes y amarillos en las secuencias consenso y de TcCAL1, respectivamente. El grado de conservación de un determinado aminoácido en cada posición está representado por una escala que va desde un sombreado de color negro, pasando por el gris hasta llegar al blanco o sin sombreado

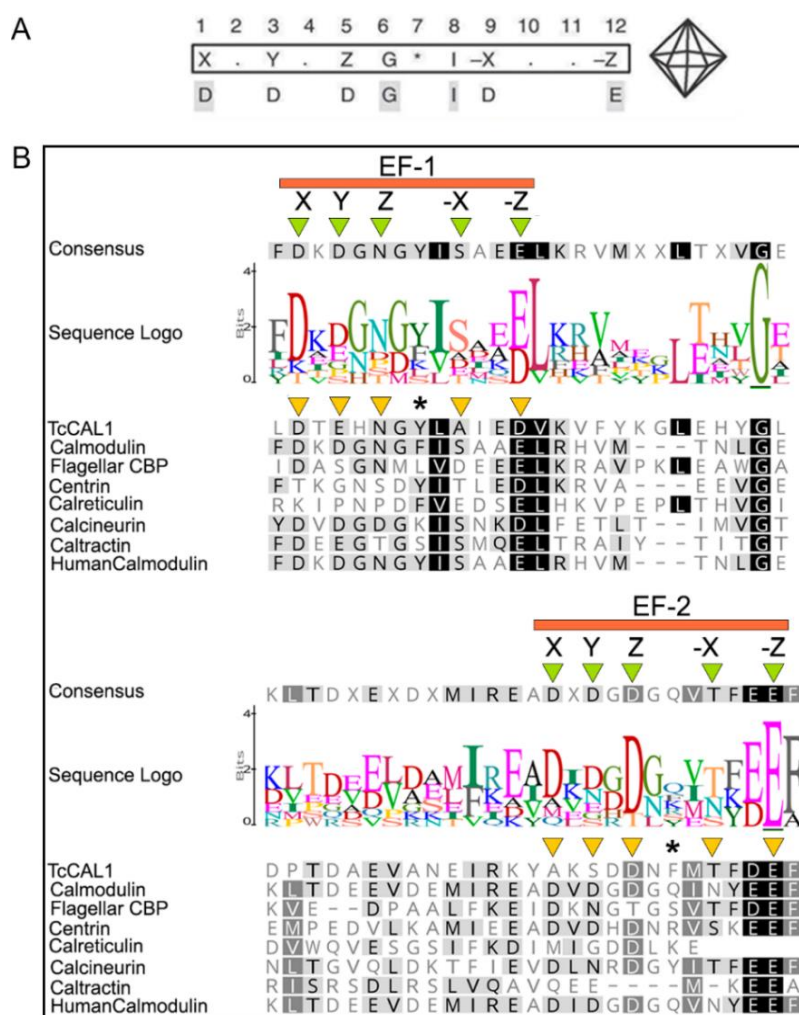


Figura 5. Alineamiento de TcCAL1 con proteínas con dominios *EF-hand* canónico. **A.** Patrón de secuencia aminoacídica de un motivo *EF-hand* canónico. Se muestran los aminoácidos ácidos (D o E) que coordinan el ion Ca^{2+} en las posiciones 1, 3, 5, 9 y 12 representadas con los ejes X, Y, Z, -X y -Z, respectivamente. Los aminoácidos más conservados en el motivo *EF-hand* están sombreados y el aminoácido de la posición 7 (*), denota un residuo que participa activamente en la coordinación del ion. **B.** Alineamiento múltiple con la secuencia aminoacídica de TcCAL1, calmodulina (TcCLB.507483.39), proteína flagelar de unión a Ca^{2+} (TcCLB.506749.20), centrina (TcCLB.508727.18), calreticulina (TcCLB.509011.40), calcineurina (TcCLB.506869.50), caltractina (TcCLB.510181.150) de *T. cruzi* y calmodulina humana (GenBank: AAA35635.1). Se muestran los dos dominios *EF-hand* de TcCAL1, EF-1 y EF-2, que alinean con dominios de las proteínas con función de unión a Ca^{2+} conocida. Los triángulos verdes y amarillos denotan los aminoácidos que participan en la unión del Ca^{2+} en la secuencia consenso y de TcCAL1, respectivamente. El (*) denota el residuo 7 en la secuencia del bucle que tiene una participación en la coordinación del Ca^{2+} con la cadena principal. La secuencia Logo representa la conservación de cada aminoácido en cada posición particular del alineamiento.

La información obtenida para TcCAL1 a partir del alineamiento múltiple, se resume en la tabla 3 con énfasis en los aminoácidos que participan directamente en la unión de Ca^{2+} .

El *EF-hand* cercano al extremo N-terminal de TcCAL1 (EF-1), conserva tres de los cinco de los residuos que participan coordinación del ion, en las posiciones 1, 3 y 12. El residuo de la posición 12, presenta un cambio de ácido glutámico (E) a ácido aspártico (D). Mientras que, las posiciones 5 y 9 están ocupadas por los aminoácidos asparagina (N) y alanina (A), respectivamente. El residuo en la posición 7(*) es un residuo de tirosina (Y). Por otro lado, el *EF-hand* cercano al extremo C-terminal, (EF-2), cumple únicamente con dos de los cinco aminoácidos canónicos, en las posiciones 5 y 12, mientras que 1, 3 y 9 están ocupados por los residuos alanina (A), serina (S) y treonina (T), respectivamente. El residuo en la posición 7(*) es una fenilalanina (F). En cuanto a los demás residuos canónicos conservados, el motivo EF-1 de TcCAL1 presenta el residuo de glicina (G) en la posición 6 y un residuo de asparagina (N) en la misma posición del EF-2. En la posición 8, presenta residuos de leucina (L) y metionina (M) en el EF-1 y EF-2, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación del bucle de unión a Ca^{2+} canónico, con EF-1 y EF-2 de TcCAL1.

Eje	X		Y		Z		*		-X		-Z	
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sec. canónica	D	L	D	G	D	G	T	I	D	F	E	E
% de aparición	100%	29%	76%	56%	52%	96%	23%	68%	32%	23%	29%	92%
Sustituciones probables		AQT VIS ER	NS	KR N	SN		PQ KY ER	VL	STE NG Q	YA TL EK	DK AP N	D
TcCAL1 EF-1	D₄₂	T	<u>E₄₄</u>	H	N ₄₆	G	Y ₄₈	L	A	I	E	<u>D₅₃</u>
TcCAL1 EF-2	A ₈₁	K	S ₈₃	D	D₈₅	N	F ₈₇	M	T	F	D	E₉₂

Los residuos conservados en los EF-1 y EF-2 de TcCAL1 con la secuencia canónica, están representados en negrita y color rojo con la ubicación en la secuencia de TcCAL1 indicada con un subíndice. Los residuos que experimentan un cambio sinónimo se muestran subrayados. También, se indican los aminoácidos que sustituyen con más probabilidad cada posición.

3.3 Predicción de sitios de unión a Ca^{2+} y análisis estructural

Se realizó otra aproximación bioinformática para validar la información obtenida de los *EF-hands* de TcCAL1 a partir de la secuencia primaria, pero a nivel de estructura secundaria (Tabla 4). Para esto se empleó el modelado obtenido con *AlphaFold*, que permitió predecir a los aminoácidos que estarían participando en la coordinación del

Ca²⁺, utilizando los servidores COACH y COFACTOR para la identificación de sitios de unión proteína-ligando y función basada en estructura, respectivamente. Como resultado, COACH ubica los aminoácidos que coordinan el ion Ca²⁺ en los residuos 42, 44, 46, 48 y 53 (C-score= 0.30) y los residuos 48, 81, 83, 85, 87 y 92 (C-score= 0.21). Estas posiciones coinciden con los EF-1 y EF-2 de TcCAL1.

Tabla 4. Predicción de sitios de unión a Ca²⁺ con el servidor COACH.

COACH Results						
Rank	C-score	Cluster size	PDB Hit	Lig Name	Download Complex	Consensus Binding Residues
1	0.30	185	4ii1C	CA	Rep. Mult	42,44,46,48,53
2	0.21	143	2k0jA	CA	Rep. Mult	48,81,83,85,87,88,89,92
3	0.12	67	2obhA	PEPTIDE	Rep. Mult	33,36,40,41,54,57,60,61,66,76,79,80,88,93,96,97,99
4	0.09	55	2mkpC	PEPTIDE	Rep. Mult	32,33,34,36,37,40,57,58,60,61,66,67,68,72,93,97,101,102

La predicción de sitios de unión a Ca²⁺ por los aminoácidos correspondientes se encuentran indicadas con un cuadro de color rojo.

Por otro lado, el servidor COFACTOR coincide con COACH en la predicción de los residuos que participan en la unión del catión son aminoácidos de las posiciones 42, 44, 46, 48 y 52 (C-score= 0.32) y los residuos 81, 83, 85, 87 y 92 (C-score= 0.12), coincidiendo con las regiones EF-1 y EF-2 de TcCAL1 (Tabla 5). El C- score es un valor entre 0-1 que representa el nivel de confianza de la predicción del ligando, en este caso el Ca²⁺.

Tabla 5. predicción de sitios de unión a Ca²⁺ con el servidor COFACTOR.

COFACTOR Results									
Rank	C-score ^a	PDB Hit	TM-score	RMSD ^b	IDEN ^c	Cov ^d	BS-score ^e	Lig. Name	Predicted binding site residues
1	0.32	3u0kA	0.658	2.78	0.211	0.786	1.53	CA	42,44,46,48,52
2	0.14	2w73F	0.637	1.35	0.182	0.699	1.28	PEPTIDE	32,33,37,40,41,58,61,76,93,96,97,99
3	0.14	1givA	0.635	2.88	0.216	0.806	0.89	DPD	41,54,58,76,77,80,88,96,97
4	0.12	2f2oB	0.638	1.26	0.187	0.699	1.35	CA	82,84,86,87,92
5	0.12	1cm1A	0.633	2.91	0.179	0.796	1.41	CA	48,85,87

La predicción de sitios de unión a Ca²⁺ por los aminoácidos correspondientes se encuentran indicadas con un cuadro de color rojo.

Luego, con la información obtenida del alineamiento múltiple y los predictores COACH y COFACTOR, se construyeron modelos tridimensionales de la estructura de TcCAL1 localizando los iones Ca²⁺ en el sitio de unión de cada *EF-hand* (Fig. 6). Los modelos se centran en la visualización del bucle de unión a Ca²⁺ de EF-1 y EF-2, presentes en TcCAL1.

Las estructuras del EF-1 de TcCAL1, muestran que los grupos carboxilos de las cadenas laterales de los residuos D42, E44, N46 y D53 interactúan con el Ca^{2+} , mientras que el residuo Y48 participa en la coordinación del ion con el grupo carboxilo disponible la cadena principal (Fig. 6 A). Por otro lado, en el EF-2 los aminoácidos S83, D85 y E92, coordinan el Ca^{2+} con sus grupos carboxilos de las cadenas laterales, mientras que A81 y F87, interactúan con los grupos carboxilos de las cadenas principales. También, se pudo observar la participación del residuo E92 como ligando bidentado (Fig. 6B). Este comportamiento es típico del aminoácido conservado en la posición 12 del motivo *EF-hand* canónico.

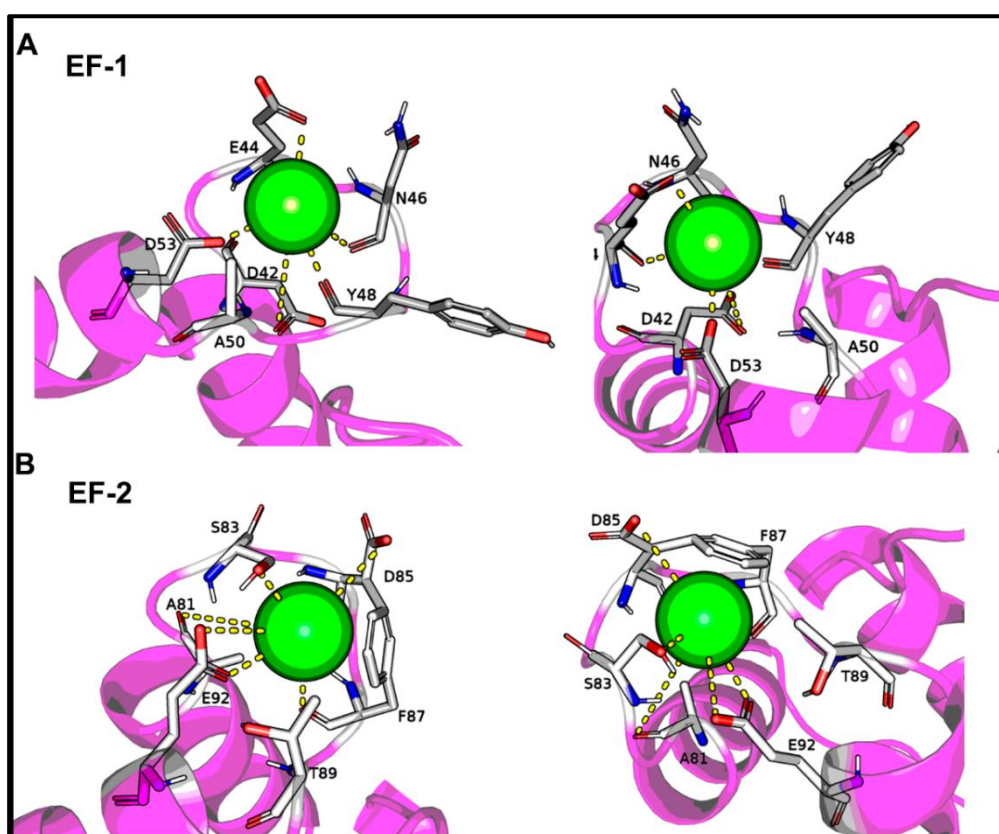


Figura 6. Modelo tridimensional de los bucles de los motivos EF-1 y EF-2 de TcCAL1 coordinando el ion Ca^{2+} . Se muestran las estructuras que forman las cadenas laterales y principales de los residuos participantes en la coordinación de Ca^{2+} en forma de *sticks* (bastones) de EF-1 y EF-2 de TcCAL1 (A y B, respectivamente). El Ca^{2+} se encuentra representado en forma de esfera de color verde y las interacciones con el ion se encuentran representadas con líneas punteadas de color amarillo. Cada aminoácido está identificado con la abreviatura de una letra y el número de la posición en la secuencia de la proteína.

3.4 Predicción de modificaciones post-traduccionales: Palmitoilación

La secuencia de TcCAL1 posee dos residuos de cisteínas en las posiciones 94 y 95, que forman parte del extremo terminal del EF-2 pero que no estarían involucrados

en la coordinación del Ca^{2+} . Se exploró la posible palmitoilación en TcCAL1 (modificación postraducciona por adición de cadenas de ácidos grasos a residuos de cisteína), utilizando el software CSS-Palm 4.0. Como resultado, este programa predice que dichos residuos son susceptibles de ser palmitoilados, con índices de confianza o scores de 7.272 y 6.38 para los residuos C94 y C95, respectivamente (Fig. 7). Para este caso el valor de confianza de la predicción puede tener valores desde 1 a 10, siendo 10 el de mayor confianza.

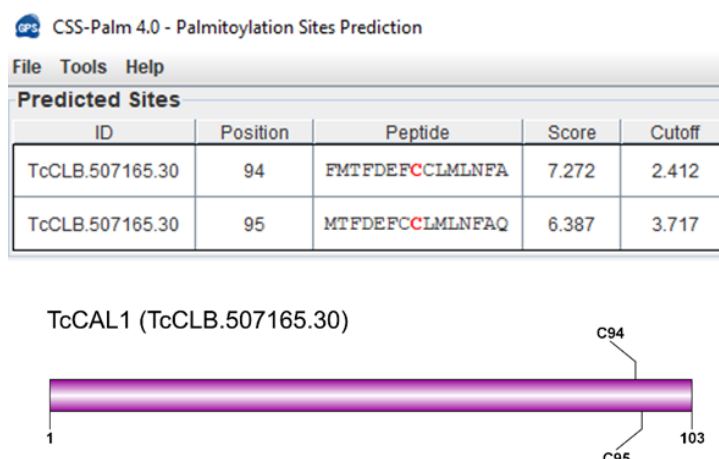


Figura 7. Predicción de sitios palmitoilables de TcCAL1 utilizando CSS-Palm 4.0. Se muestra el resultado gráfico del análisis y la posición de las cisteínas potencialmente palmitoilables en la secuencia de 103 aminoácidos de TcCAL1.

PARTE II. Rol de TcCAL1 en la modulación de Ca^{2+} intracelular y en el ciclo de vida de *T. cruzi*

En esta parte del trabajo, se generaron cultivos de *T. cruzi* recombinantes que sobreexpresan TcCAL1 fusionada a una etiqueta de seis histidinas (TcCAL1x6His), así como también parásitos con el gen que codifica para esta proteína interrumpido por CRISPR/CAS9. Con estos cultivos se estudiaron diferentes procesos biológicos del ciclo de vida, como la proliferación, diferenciación hacia formas proliferativas y no proliferativas, e invasión a células de mamífero. Se realizó un abordaje preliminar para estudiar el rol de TcCAL1 en la modulación del Ca^{2+} intracelular del parásito a través de ensayos de fluorescencia con el indicador de Ca^{2+} Fura 2-AM.

3.5 Obtención de antisuero policlonal anti-TcCAL1x6His

El antisuero contra TcCAL1 se obtuvo inmunizando ratones con la proteína de fusión recombinante TcCAL1x6His (3.14 en el apartado III de esta sección). Para comprobar la reactividad del suero anti-TcCAL1x6His, se realizó *western blot* en el que se enfrentó la proteína recombinante purificada con diferentes diluciones del antisuero.

El suero obtenido reconoce a la proteína en diluciones de 1:20 a 1:2000, mientras que el suero pre-inmune no presenta reactividad (Fig. 8).

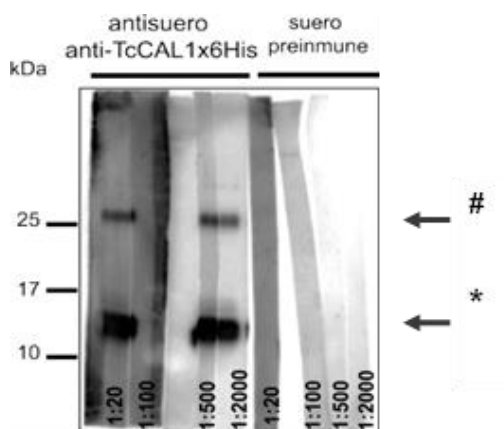


Figura 8. Prueba de especificidad de antisuero TcCAL1x6His. La proteína TcCAL1x6His se separó por electroforesis *SDS-PAGE* en gel de poliacrilamida y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con diferentes diluciones del suero recuperado de los ratones inmunizados con la proteína recombinante purificada. En cada calle se indican las diluciones empleadas. El antisuero reconoce tanto al monómero (~13.6 kDa) como al dímero (~27 kDa) de TcCAL1x6His (* y #). Estas formas oligoméricas son producto de la sobreexpresión de TcCAL1 en *E. coli* (ver apartado 3.15 de esta sección).

3.6 Expresión y localización subcelular de TcCAL1 en *T. cruzi*

Al comenzar este trabajo las evidencias experimentales de expresión de TcCAL1, se habían llevado a cabo por análisis de distintos proteomas en otros grupos de investigación. Puesto que no teníamos conocimiento de su expresión en las cepas que se cultivan en nuestro laboratorio (CL, Y y Dm28c), se analizó su presencia por ensayos de *western blot*, empleando el suero anti-TcCAL1x6His (anti-CAL1) en fracciones enriquecidas en proteínas citoplasmáticas y microsomales de epimastigotes de *T. cruzi*. Como resultado, se encontró que TcCAL1 se expresa mayoritariamente en la fracción soluble de lisados proteicos (Fig. 9 A).

Luego, se realizó un estudio comparativo de los niveles de expresión de TcCAL1 en distintos estadios del parásito mediante *western blot* (Fig. 9 B, panel izquierdo). Se encontró que TcCAL1 se expresa en los 3 estadios evaluados, a niveles significativamente mayores en las formas tripomastigotes respecto a las formas epimastigotes (Fig. 9 B, panel derecho). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de TcCAL1 cuando se compararon las formas tripomastigotes o epimastigotes con amastigotes axénicos.

Posteriormente, se estudió la localización subcelular de TcCAL1 en formas epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes intracelulares por microscopia de

inmunofluorescencia utilizando el suero anti-CAL1. Se encontró que TcCAL1 presenta una localización intracelular en todo el cuerpo del parásito, en los tres estadios estudiados. Este patrón resultó muy similar a la localización que exhibe la proteína citosólica Cyp19 (Fig. 9C).

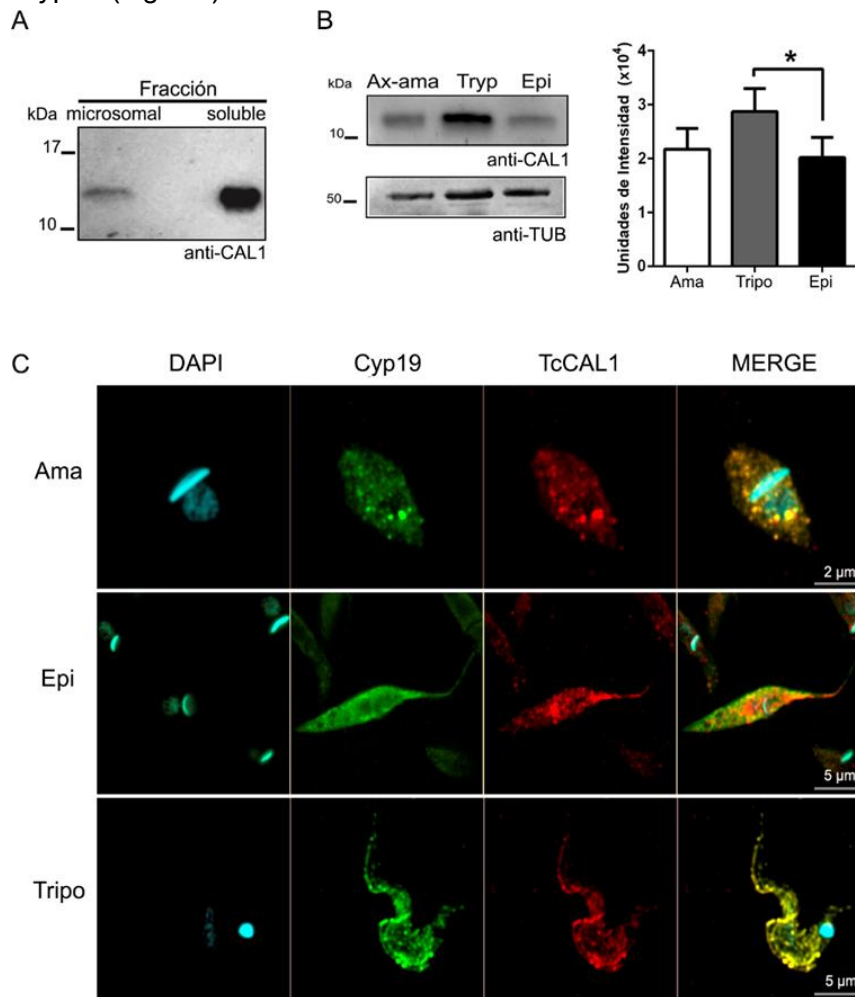


Figura 9. Expresión y localización subcelular de TcCAL1 endógena en *T. cruzi*. **A.** Expresión de TcCAL1 endógena en fracción microsomal y soluble de epimastigotes de *T. cruzi* utilizando el suero anti-CAL1. **B.** Izquierda. Expresión de TcCAL1 endógena en lisados proteicos de diferentes estadios de *T. cruzi*. Derecha. Cuantificación de la expresión de TcCAL1 endógena en distintos estadios del parásito. Los niveles de proteína están expresados en unidades de intensidad de área de la banda detectada en el *western blot*. El análisis estadístico mediante *t-student*, mostró que existen diferencias significativas en la expresión de las formas tripomastigotes y epimastigotes (p value=0.05, $*p<0.05$). **C.** Localización de TcCAL1 endógena en distintos estadios del parásito. Ama, Epi y Tripo denotan las formas amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes derivados de células, respectivamente. DAPI y Cyp19, indican el marcaje de núcleo y kinetoplasto y la señal dada por el antisuero anti-Cyp19, respectivamente. Anti-TcCAL1 indica la señal dada por el antisuero anti-TcCAL1x6His. anti-CAL1: antisuero anti-TcCAL1x6His. Anti-TUB: anti-Tubulina. kDa: kilodalton. Se muestran resultados representativos con la cepa Dm28c.

3.7 Silenciamiento del gen *tcca1* mediante CRISPR/CAS9

Para generar cultivos que presenten menores niveles de expresión de TcCAL1, se utilizó la técnica de CRISPR/CAS9 para interrumpir el gen, de una sola copia, que codifica esta proteína en epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y. Se diseñaron RNAs guías (sgRNAs) para direccionar el corte de la enzima Cas9 de *S. pyogenes* y ultrámeros, para generar brazos de recombinación homóloga, que permitan el reemplazo del gen que codifica para TcCAL1 por el de resistencia a blasticidina (*bsd*). Se diseñaron dos sgRNAs distintos, utilizando la herramienta de diseño de guías CRISPR de RNA/DNA para patógenos eucariotas disponible en la página web <http://grna.ctegd.uga.edu/>. Los gRNAs se diseñaron para dirigir el corte a los nucleótidos 1 y 53 de la secuencia de TcCAL1, con el fin de transformar epimastigotes con dos estrategias de corte distintas y aumentar las posibilidades de obtener cultivos editados genéticamente (Fig. 10 A).

La figura 12 B, muestra la obtención de los fragmentos de los tamaños esperados (122 pb) para los sgRNAs 1 y 53, así como la restricción con la enzima BamHI del vector pTREX-n/CAS9, respectivamente (Fig. 10 C). Además, se obtuvo el brazo de homología correspondiente al gen de resistencia a blasticidina (*H-bsd*) de 399 pb flanqueado por 100 pb de los extremos 5' y 3'UTRs del gen *tcca1*. El amplificado final obtenido fue del tamaño esperado, 599 pb (Figura 10 C). Seguidamente, los sgRNAs se clonaron en el vector pTREX-n/CAS9 digerido y purificado y se seleccionaron colonias recombinantes; la construcción se corroboró por secuenciación utilizando el oligonucleótido HX1 *reverse* (Fig. 11).

Los vectores pTREX-n/sgRNA1, pTREX-n/sgRNA53 y el *H-bsd*, se purificaron y se utilizaron para transfectar epimastigotes de la cepa Y. El vector sin secuencia blanco en el genoma de *T. cruzi*, pTREX-n/*scrambled*RNA, se utilizó para generar cultivos control. Una vez transfectados, los cultivos se seleccionaron con concentraciones crecientes de los antibióticos G418 y *bsd*, partiendo de 100 µg y 10 µg, hasta alcanzar concentraciones de 500 µg y 25 µg, respectivamente. Los parásitos transfectados con el plásmido pTREX-n/sgRNA1, conteniendo el sgRNA dirigido al nucleótido 1 no sobrevivieron a la etapa de selección por motivos de contaminación; se continuó el trabajo únicamente con los parásitos editados con el RNA guía dirigido al nucleótido 53 de la secuencia de *tcca1*.

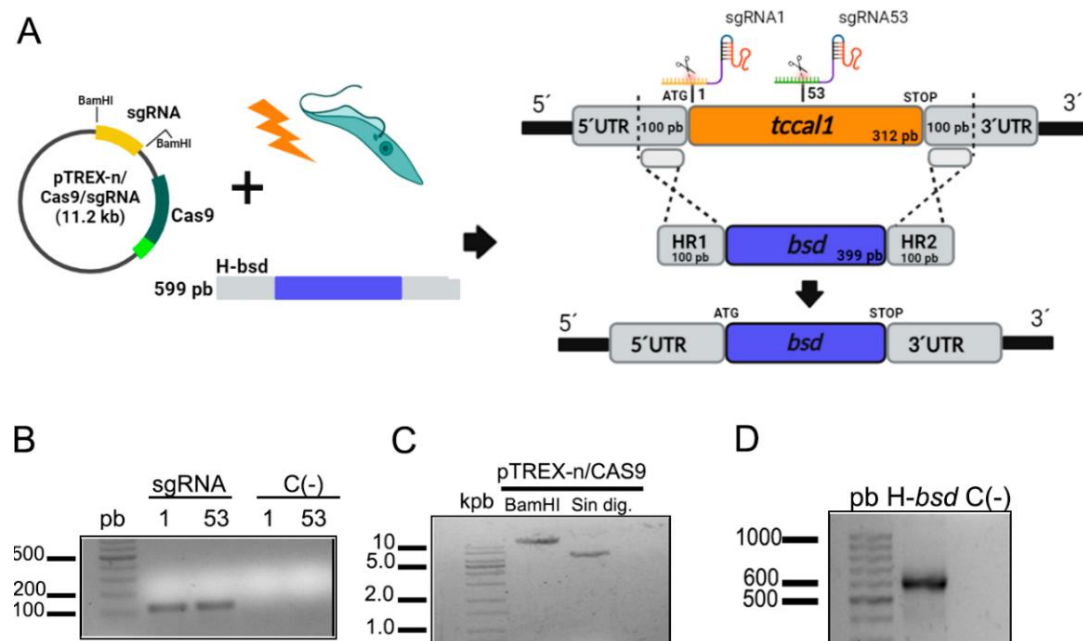


Figura 10. Estrategia de silenciamiento de *tccal1* por CRISPR/CA9, obtención de sgRNAs, H-bsd y restricción de pTREX/CAS9 para el silenciamiento de *tccal1*. **A.** Representación esquemática de la estrategia utilizada para la edición génica por CRISPR/Cas9 del gen *tccal1*. Este sistema se expresó constitutivamente la Cas9 junto a los sgRNAs 1 o 53 a través del vector pTREX-n/Cas9/sgRNA y los brazos de homología para recombinación fueron generados por PCR (H-bsd). El cassette de reparación que contiene 100 pb de las regiones homólogas 5' y 3'UTR del gen *tccal1* (HR1 y HR2) fusionadas al gen de resistencia a blasticidina (*bsd*). La integración se promovió después de la rotura de doble cadena generada por la enzima Cas9, a través de los sgRNAs dirigidos a los nucleótidos 1 y 53 del gen *tccal1*. **B** Productos de PCR de 122 pb correspondientes a los sgRNA 1 y 53 de la secuencia de *tccal* (sgRNA 1 y 53). C(-) controles negativos de cada reacción de PCR. **C.** Vector pTREX-n/CAS9 linealizado con la enzima BamHI (11.1 kpb) (BamHI) y sin digerir como control de digestión (Sin dig). **D.** Producto de PCR de 599 pb correspondientes al brazo de homología formado por el gen de resistencia a *bsd* flanqueado por 100 pb 5'UTR y 3'UTR del gen *tccal1* (H-bsd). C(-) Control negativo de la reacción de amplificación. Gel de garosa al 1,5 % (m/v) pb: Marcador de peso molecular de 100 pb (PBL 100 pb). kpb: kilopares de bases. Marcador de peso molecular de 1000 pb (PBL 1 kb).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment		
sgRNA1	-----GATCGGATCCATGCAACGCAGTCTAA	26
Clon1_HX1	GGAACATGTATCGCTGCATATTTTGAGAACTCGTTGGGGGATCCATGCAACGCAGTCTAA *****	60
sgRNA1	TCGCGTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA	86
Clon1_HX1	TCGCGTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA *****	120
sgRNA1	AAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTGGATCCACTG-----	122
Clon1_HX1	AAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTGGATCCACTAGAACTCTTGACACAGACTTGGCATC *****	180
sgRNA53	-----GATCGGATCCCAACCGTCACCTCA	24
Clon2_HX1	GGATTCAAGGGATCGCTGCATATTTTGAGAACTCGTTGGGGGATCCCAACCGTCACCTCA *****	60
sgRNA53	ATTATGGTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA	84
Clon2_HX1	ATTATGGTTTGTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA *****	120
sgRNA53	AAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTGGATCCACTG-----	122
Clon2_HX1	AAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTGGATCCACTAGAACTCTTGACACAGACTTGGCA *****	180

Figura 11. Análisis por secuenciación de colonias obtenidas del clonado de sgRNAs en el vector pTREX-n/CAS9. Las colonias pTREX-n/CAS9 positivas por restricción con la enzima BamHI se secuenciaron con el oligonucleótido HX1 reverse. Las secuencias coloreadas en azul y violeta corresponden a la secuencia del sgRNA que hibrida en el gen *tccal1* y que funcionan de andamio del sgRNA, respectivamente. Las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de restricción de BamHI.

Los clones que mostraron menores niveles de TcCAL1 mediante *western blot* se seleccionaron y analizaron mediante *colony* PCR, utilizando combinaciones de oligonucleótidos diseñados para distintas regiones del gen *tccal1* o *bsd* (Fig. 12 A). En primera instancia y con el objetivo de determinar la presencia del *bsd* en los parásitos en el contexto genómico del gen *tccal1*, se utilizaron oligonucleótidos diseñados para una secuencia codificante de una proteína hipotética aguas arriba del 5'UTR de *tccal1* (P4) y un oligonucleótido *reverse* diseñado en la región del 3'UTR del gen *tccal1* (P2). Con este par de oligonucleótidos se esperaba obtener fragmentos amplificados de 970 pb (indicador de presencia del gen *bsd* luego de la edición) o de 880 pb (presencia del gen *tccal1* del genotipo *wild type*, WT). Como resultado, se obtuvieron fragmentos amplificados de 880 pb en todas las muestras analizadas: los clones C4, C7, C8, C11, C12, la población de parásitos policlonal antes de la selección clonal (Pob), los parásitos transfectados con el sgRNA *scrambled* (Scr), los parásitos WT (WT) y el DNA genómico de *T. cruzi* utilizado como control, indicando la presencia del gen *tccal1*. Sin embargo y a pesar de haber realizado diferentes modificaciones en los parámetros de amplificación

de la PCR, no se pudo confirmar la presencia del gen *bsd* con este par de oligonucleótidos (Fig.12 B).

Una segunda *colony*-PCR se empleó para verificar si los clones analizados contenían el gen *bsd* en el locus esperado, reemplazando al gen *tccal1*. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos P4 *forward* y P3 *reverse* (este último dirigido específicamente a una región interna en el gen *bsd*). En esta instancia, se seleccionaron 3 clones para reducir el volumen de muestra y optimizar el análisis. Como resultado, se obtuvo un fragmento amplificado de 680 pb en los clones C4, C11, C12 y Pob, lo que indica la presencia del gen *bsd* en el contexto genómico de *tccal1*. Por otro lado, en las muestras Scr, WT y pGEM-T/*bsd* no se obtuvieron fragmentos amplificados, como se esperaba (Fig. 12 C).

Posteriormente, con el objetivo de verificar si el gen *tccal1* también se encontraba presente en estos clones, estas muestras se analizaron utilizando los oligonucleótidos P2 *reverse* y CAL3 específico de una región interna de *tccal1*. Se obtuvieron amplificados de 422 pb que indica la presencia de *tccal1* en los clones C4, C11, C12 y la población sin clonar (Pob). También, como se esperaba, se obtuvo este mismo amplificado en los parásitos transfectados con el sgRNA*scrambled* y los parásitos WT (Fig. 12 D). Adicionalmente, fragmentos amplificados de los clones C11 y C12 con los oligonucleótidos P4 y P3 se enviaron a secuenciar y se encontró el gen *bsd* insertado en el locus de *tccal1*.

En conjunto, el resultado de estos análisis sugiere que ambos genes, *tccal1* y *bsd*, se encuentran presentes en los clones y, por lo tanto, se obtuvieron parásitos *hemi-knockout* para el gen *tccal1*, luego de la edición génica usando la herramienta CRISPR/CAS9.

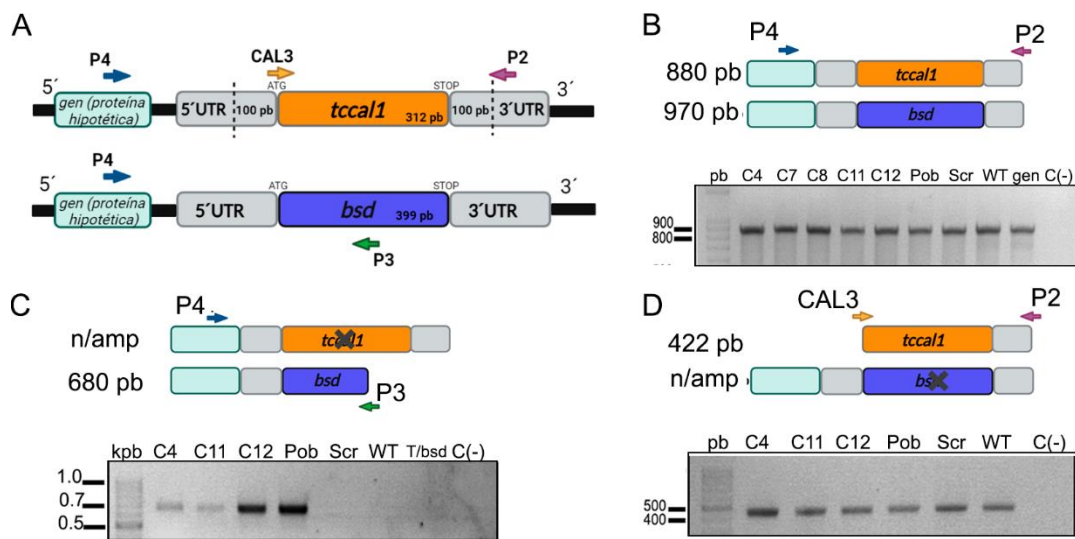


Figura 12. Análisis de clones editados mediante CRISPR/CAS9. **A.** Representación esquemática de la estrategia de análisis de clones mediante PCR para verificar la integración del brazo de homología *H-bsd* en el locus del gen *tccal1*. Se usaron oligonucleótidos dirigidos a un gen codificante para una proteína hipotética aguas arriba (P4), al inicio (CAL1) y a la región 3' UTR del gen *tccal1* (P2), respectivamente. Se utilizó un oligonucleótido a una región interna del gen *bsd* (P3). Todos los oligos están indicados con flechas. **B.** Productos de PCR (~880 pb- presencia de gen *tccal1*) obtenidos con los oligonucleótidos P4 y P2. **C.** Los amplicones obtenidos en con los oligonucleótidos P4 y P3 (~680 pb- presencia de gen *bsd*). **D.** Productos de PCR (~422 pb- presencia de gen *tccal1*) obtenidos con los CAL3 y P2. En la parte superior de cada figura se muestran los fragmentos esperados según el par de oligonucleótidos utilizado. C4: Clon 4, C7: Clon 7, C8: Clon 8, C11: Clon 11, C12: Clon 12, Pob. Población sin clonar, Scr: Clon transfectado con sgRNA *scrambled*. WT: parásitos *wild type*, gen: DNA genómico, *T/bsd*: plásmido pGEM-T/*bsd*, C(-): control negativo. n/amp: no se espera amplificado, pb: Pares de bases. Kpb: Kilopares de bases.

A partir de esas conclusiones, se seleccionaron los clones C4, C11 y C12 para analizar los niveles de expresión de la proteína TcCAL1 y compararlos con muestras provenientes de cultivos sin edición génica. Se realizaron ensayos semicuantitativos de *western blot* con muestras de extractos totales de proteína de cultivos de epimastigotes incubados con el suero anti-CAL1 y un anticuerpo de control de carga anti-tubulina (anti-TUB). Se comparó la intensidad de las bandas correspondientes a la señal de TcCAL1 de las distintas muestras en tres experimentos independientes (Fig. 13 A). Esta señal se cuantificó y relativizó respecto a la señal obtenida para la proteína utilizada como control de carga (tubulina). La intensidad relativa se normalizó a la señal de los parásitos Scr

(transfectados con sgRNA *scrambled*) usados como control y se graficó expresada como intensidad relativa normalizada. Como resultado, se encontró una disminución significativa de la expresión de TcCAL1, tanto en la población policlonal como en todos los clones analizados en comparación a los controles, representados en este caso por los parásitos WT y los Scr (transfectados con el RNA *scrambled*). Sin embargo, el clon 11 mostró los niveles de expresión más bajos con respecto a los parásitos control (Fig. 13 B). Por otro lado, es interesante mencionar que los parásitos WT y los Scr no muestran diferencias significativas en la expresión de TcCAL1.

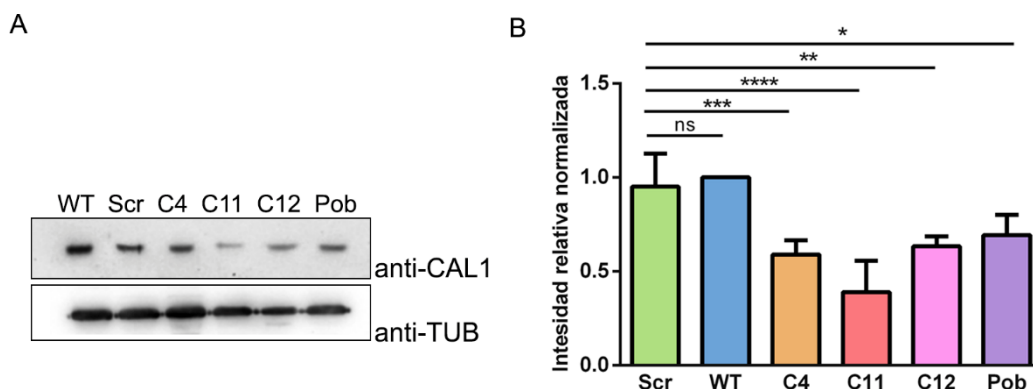


Figura 13. Análisis de expresión de la proteína TcCAL1 en parásitos editados mediante CRISPR/CAS9 de *T. cruzi*. Los lisados proteicos de epimastigotes de la cepa Y sometidos a edición génica mediante CRISPR/CAS9 fueron analizados por *western blot*. **A.** *Western blot* que muestra la señal obtenida con el anti suero anti-TcCAL1x6His (anti-CAL1). Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-Tubulina para revelar la proteína tubulina utilizada como control de carga. **B.** Intensidad relativa normalizada de las señales obtenidas por *western blot* de la expresión de TcCAL1 en los parásitos editados mediante CRISPR/CAS9. El *western blot* que se muestra es representativo de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó a través de un ANOVA de una vía (**p* value<0.05, ***p* value<0.01, ****p* value<0.001, *****p* value<0,0001, *ns* *p* value >0.05. no significativo). WT: wild type, SCR: scrambled, C4: clon4, C11: clon 11, C12: clon 12, Pob: población sin clonar. Se muestra un experimento representativo de tres ensayos independientes.

3.8 Sobreexpresión de TcCAL1 en *T. cruzi*

La secuencia que codifica para la proteína de fusión TcCAL1x6His se amplificó por PCR a partir del vector recombinante pET22b/TcCAL1x6His y se utilizó para clonar este fragmento en el plásmido pTREX. Este vector permite la expresión constitutiva de genes en *T. cruzi*. debido al control del promotor de genes ribosomales, así como la secuencia de integración al locus de DNA ribosomal que permite la integración del vector DNA genómico del parásito.

El vector recombinante pTREX/*tccal1x6His* se obtuvo por clonado en bacterias, y la presencia de la construcción de interés se confirmó mediante PCR de colonias con los oligonucleótidos TREX1 y TREX2 dirigidos a las regiones HX1 y GAPDH del vector pTREX, respectivamente. Posteriormente, se seleccionaron colonias positivas para purificar del plásmido recombinante y confirmar la presencia de *tccal1* a través de secuenciación con los oligonucleótidos TREX1 y CAL4. Los resultados de la secuenciación confirmaron la obtención del plásmido recombinante pTREX/*tccal1x6His*, con 100% de identidad con la secuencia de *tccal* con la etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal.

Luego, midi-preparaciones del plásmido recombinante pTREX/*tccal1x6His* o el vector vacío pTREX (control), se utilizaron para transfectar epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas CL e Y. Los cultivos se seleccionaron con el antibiótico G418 y como resultado, se obtuvieron cultivos policlonales sobreexpresantes de TcCAL1x6His en ambas cepas. La sobreexpresión de TcCAL1x6His se confirmó por *western blot* e inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-CAL1 (Fig. 14 A). En los cultivos sobreexpresantes, se detectaron dos bandas de 14 kDa y 12 kDa correspondientes a la TcCAL1 recombinante (TcCAL1x6His) y la proteína endógena (TcCAL1), respectivamente. Es importante mencionar que la proteína no fue detectada al utilizar anticuerpos anti-His en análisis de *western blot* e inmunofluorescencia. Los análisis se realizaron incluso empleado anticuerpos monoclonales específicos para etiquetas de histidina localizados en la región C-terminal sin éxito. Este inconveniente puede surgir cuando la etiqueta de histidinas de la proteína no es accesible al anticuerpo (Debeljak *et al.*, 2006). En consecuencia, para comprobar que los parásitos sobreexpresan la TcCAL1 con etiqueta de x6His, se realizó una purificación a pequeña escala de TcCAL1x6His a partir de epimastigotes. El revelado de un *western blot* utilizando el anticuerpo anti-CAL1 confirmó la presencia de la proteína recombinante en los cultivos sobreexpresantes al comparar con las fracciones de eluidos de los cultivos control, en la cual no se detectó TcCAL1 post-purificación (Ver anexos, Fig. 39).

Por otro lado, se analizó la localización de la proteína por microscopía de inmunofluorescencia en los parásitos sobreexpresantes de TcCAL1x6His con el anticuerpo anti-CAL1. La señal detectada conserva la localización citosólica que en este caso está dada tanto por las señales de la proteína recombinante y como de la TcCAL1 endógena (Fig. 14 B)

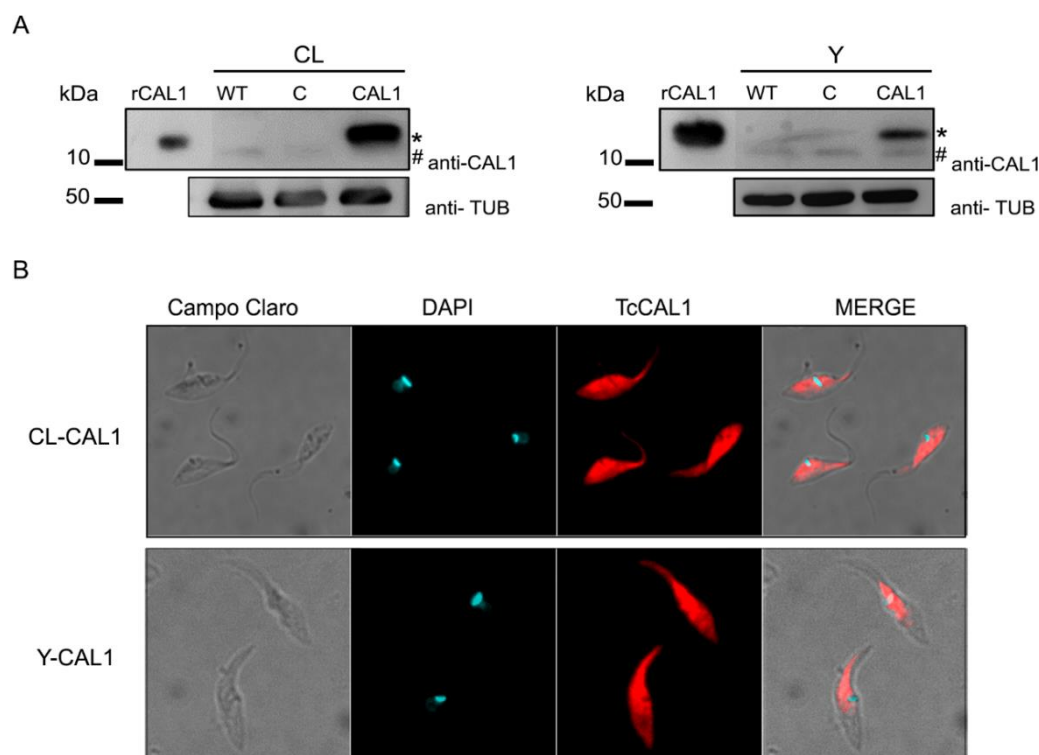


Figura 14. Sobreexpresión de TcCAL1x6His en las cepas CL e Y. A. La sobreexpresión de TcCAL1 se confirmó a través de *western blot* en la cepa CL (izquierda) e Y (derecha) utilizando un antisuero anti-TcCAL1x6His. El asterisco (*) denota la proteína TcCAL1x6His recombinante expresada en el parásito y el numeral (#) la proteína TcCAL1 endógena. La detección de tubulina (anti-TUB) se utilizó como control de carga. **B.** Localización de TcCAL1 por inmunofluorescencia en cultivos sobreexpresantes de la cepa CL (CL-CAL1) e Y (Y-CAL1) utilizando el anticuerpo anti-CAL1. Se utilizó DAPI para marcar el núcleo y kinetoplasto y el anticuerpo anti-CAL1 para detectar TcCAL1 recombinante y endógena. El campo claro muestra la forma de los epimastigotes. rCAL1: TcCAL1x6His de *E. coli*. WT: parásitos WT, C: parásitos control (transfectados con el vector pTREX vacío) CAL1: parásitos sobreexpresantes de TcCAL1x6His, anti-CAL1: antisuero anti-TcCAL1x6His, anti-TUB: anticuerpo anti-tubulina.

3.9 Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de TcCAL1 en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Una vez obtenidos los distintos cultivos recombinantes de las cepas CL e Y, se estudió el efecto de la sobreexpresión TcCAL1x6His y el silenciamiento de la proteína endógena en la proliferación de los epimastigotes. Para esto, se construyeron curvas de crecimiento por medio del registro de la concentración de parásitos a través del tiempo en estos cultivos (Fig. 15). En la cepa Y, la proliferación de los cultivos sobreexpresantes de TcCAL1x6His se compararon con los parásitos conteniendo el vector pTREX vacío, mientras que el clon 11 *hemi-knockout* (*tccal1*^{+/−}) se comparó con los cultivos sgRNA *scrambled* (Scr). En ninguna de las cepas, sobreexpresantes o *hemi-knockout*, se observaron diferencias significativas en la fase exponencial de crecimiento cuando se compraron con los respectivos controles (Fig. 15 A). Sin embargo, en los parásitos

tccal1^{+/-} se observó una entrada más temprana a la fase estacionaria crecimiento, así como en la población *tccal1*^{+/-} policlona (*tccal1*^{+/-}p), respecto a los parásitos controles (*Scrambled*) (Fig. 17 B). En ese sentido, se observaron diferencias significativas en el número máximo de parásitos al día 14, en el cultivo *tccal1*^{+/-}p y los parásitos *scrambled*. No obstante, estas diferencias no fueron significativas en los cultivos clonados *tccal1*^{+/-}. Por otra parte, si bien tampoco se observaron diferencias significativas en la proliferación durante la fase exponencial de la cepa CL, los parásitos sobreexpresantes de TcCAL1x6His alcanzaron número de parásitos menor con respecto a los controles, lo que sugiere los primeros alcanzan más tempranamente la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 15 C).

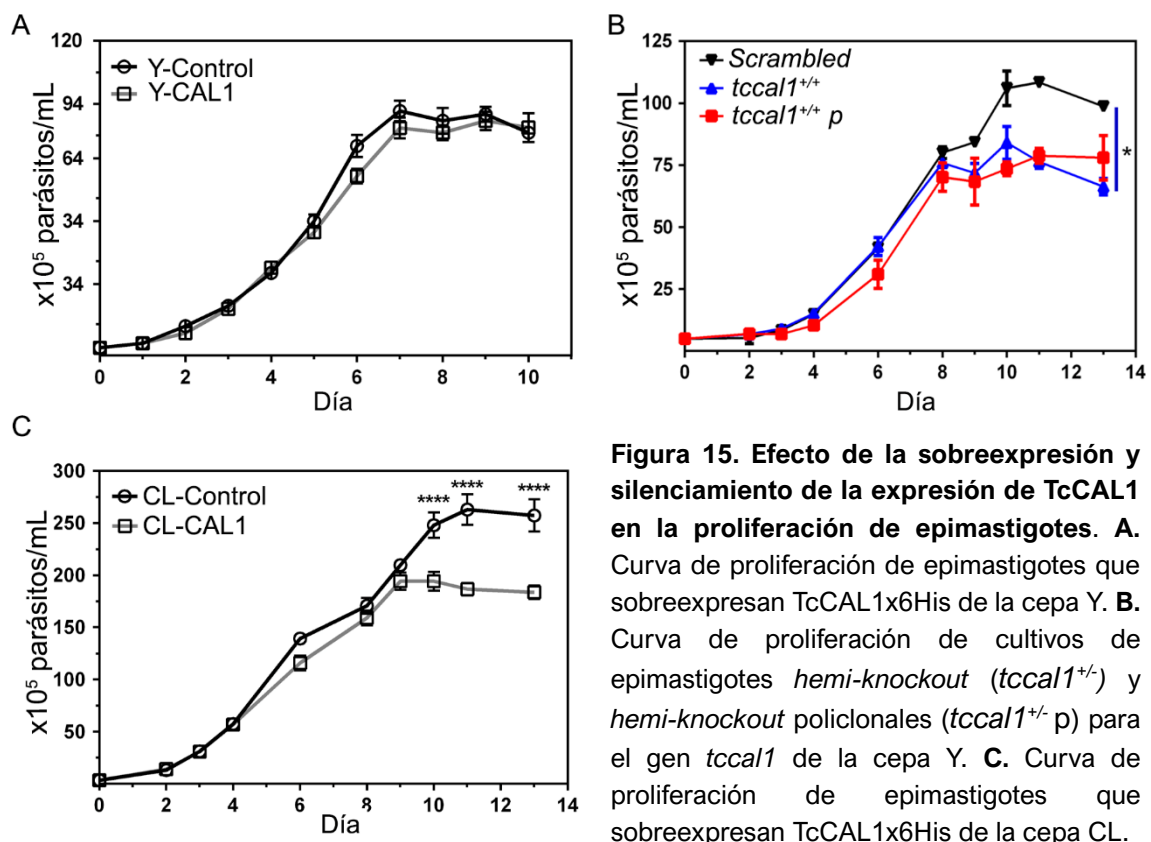


Figura 15. Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de la expresión de TcCAL1 en la proliferación de epimastigotes. A. Curva de proliferación de epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His de la cepa Y. **B.** Curva de proliferación de cultivos de epimastigotes *hemi-knockout* (*tccal1*^{+/-}) y *hemi-knockout* policlonales (*tccal1*^{+/-}p) para el gen *tccal1* de la cepa Y. **C.** Curva de proliferación de epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His de la cepa CL.

Se compararon parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His (Y-CAL1 o CL-CAL1) con sus controles (Y-Control o CL-Control). Epimastigotes de la cepa Y *tccal1*^{+/-} p o *tccal1*^{+/-} y se comparó con los controles (*Scrambled*). Las diferencias entre las curvas se establecieron mediante un análisis estadístico, utilizando una prueba ANOVA de una vía, $p < 0.0001$, ****. Los gráficos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

3.10 Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de *tccal1* en procesos de diferenciación de *T. cruzi*

Luego de estudiar el efecto de la modulación de los niveles de expresión de TcCAL1 sobre la proliferación, decidimos avanzar en la caracterización fenotípica de los cultivos recombinantes, evaluando la capacidad de diferenciarse a distintos estadios del ciclo de vida del parásito.

En primer lugar, se estudió cómo afecta la sobreexpresión de TcCAL1x6His a la metaciclogénesis, proceso de diferenciación de las formas epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos. Para esto, se ensayaron dos métodos de diferenciación *in vitro*. En uno de estos métodos, los epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His y sus controles se incubaron en el medio TAU (*Triatomine Artificial Urine*), que promueve la diferenciación hacia las formas metacíclicas, y se calculó el porcentaje de tripomastigotes en los diferentes cultivos (Fig. 16 A). A las 72 h de incubación en TAU, se encontró que los porcentajes de metaciclogénesis resultaron significativamente menores en los cultivos que sobreexpresan TcCAL1x6His, comparados con los controles ($4.7 \pm 0.6\%$ y $8 \pm 1\%$, respectivamente). En otras palabras, los epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His se diferencian un 24% menos que los cultivos con niveles fisiológicos de TcCAL1. No fue posible diferenciar epimastigotes de la cepa CL por tratamiento en TAU por lo cual, se utilizó otra estrategia que consta de incubar los cultivos en medio bifásico agar sangre/LIT (BAL). Esta incubación se realizó con ambas cepas y nuevamente se encontró que los parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His presentan menores tasas de metaciclogénesis cuando fueron comparados con sus controles, $24.4 \pm 2\%$ vs $40.3 \pm 3\%$ y $9 \pm 3\%$ vs $18.1 \pm 1\%$ para para la cepa Y y CL, respectivamente (Fig.16 A). Es decir, con este método, se encontró que la sobreexpresión de TcCAL1x6His inhibe la metaciclogénesis en un 39% y 50%, para las cepas Y y CL, respectivamente, cuando se compararon con sus controles. Para confirmar que los tripomastigotes metacíclicos continuaban sobreexpresando TcCAL1x6His, se realizó un análisis por *western blot* de lisados proteicos de los parásitos antes y después de la diferenciación (Fig. 16 B). Para esto, fue necesario aislar los metacíclicos presentes en la mezcla de parásitos sin diferenciar, de manera que la señal TcCAL1x6His provenga exclusivamente de las formas tripomastigotes y no de epimastigotes y formas intermedias. Con este fin, se construyó un control experimental en el cual se mezclaron epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His con tripomastigotes control (portadores del vector pTREX vacío). La muestra se incubó con SFB sin inactivar para lisar selectivamente los epimastigotes por el sistema del

complemento. Luego de determinados lavados se obtuvieron los tripomastigotes metacíclicos y su lisado proteico. Es esperable que, si la lisis de epimastigotes y los lavados posteriores son óptimos y suficientes, se obtenga una sola banda de señal y de un peso molecular correspondiente a TcCAL1 endógena, proveniente de los tripomastigotes metacíclicos WT. De esta manera, corroboramos que la señal compatible con la presencia de TcCAL1x6His correspondía a las formas metacíclicas exclusivamente (Fig. 16 B).

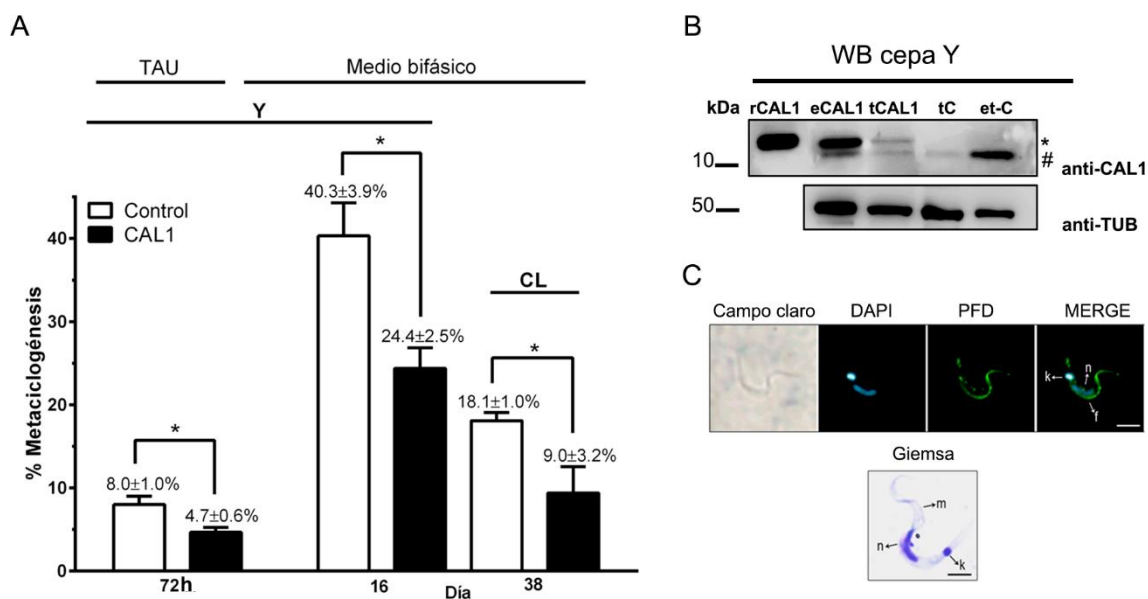


Figura 16. Efecto de la sobreexpresión de TcCAL1x6His en la metaciclogénesis de *T. cruzi*.

A. Porcentajes de metaciclogénesis de los parásitos control y parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His de las cepas CL e Y. Los métodos de metaciclogénesis, medio bifásico agar sangre/LIT y TAU, son indicados en el gráfico. El análisis estadístico se realizó a través de un test de Student (**p* value < 0.05). **B.** Análisis por *western blot* de parásitos de la cepa Y antes y después de la metaciclogénesis en medio bifásico agar sangre/LIT. la proteína recombinante TcCAL1x6His está señalada con un asterisco (*) y la proteína endógena TcCAL1 con numeral (#). eCAL1 y tCAL1: epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos que sobreexpresan TcCAL1x6His, respectivamente. tC: tripomastigotes control (con el vector pTREX vacío), et-C: control de aislamiento de tripomastigotes (muestra conteniendo epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His y tripomastigotes metacíclicos con el vector pTREX vacío), Anti-CAL1: anticuerpo anti-TcCAL1x6His. Anti-TUB: anticuerpo anti-tubulina. **C.** Microscopía de inmunofluorescencia de tripomastigotes metacíclicos diferenciados en medio bifásico agar sangre/LIT y tinción con Giemsa. Los parásitos se tiñeron con DAPI para marcar núcleo (n) y kinetoplasto (k). La morfología del flagelo (f) se con un anticuerpo que marca la proteína de bastón paraflagelar (PFD). Barra de escala: 5 µm.

En relación con los parásitos *hemi-knockout tccal1^{+/-}*, se observó una capacidad de diferenciación muy reducida, ya que el porcentaje de metaciclogénesis obtenido mediante los dos métodos empleados en este estudio fue inferior al 1%. Por otro lado, dada la baja tasa de metaciclogénesis observada en los parásitos que sobreexpresan

TcCAL1x6his de la cepa CL, no se obtuvo la cantidad necesaria de tripomastigotes metacíclicos para completar experimentos independientes en los estudios *in vitro* de TcCAL1 en el ciclo de vida del parásito. Por lo tanto, todos los análisis que siguen a partir de ahora estarán referidos exclusivamente a la cepa Y.

Luego, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de TcCAL1x6His en la amastigogénesis, proceso por el cual los tripomastigotes se diferencian a amastigotes. Para esto se realizó un ensayo de obtención de amastigotes axénicos, incubando tripomastigotes metacíclicos en medio a pH ácido hasta 12 h. Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo para calcular el porcentaje de amastigotes diferenciados en cultivos que sobreexpresan TcCAL1x6His y en controles. Los parásitos fueron evaluados a través de microscopía de fluorescencia para visualizar las posiciones relativas del DNA del núcleo y kinetoplasto, así como la presencia o ausencia del flagelo en diferentes tiempos del proceso. Además de las formas amastigotes y tripomastigotes metacíclicos, se identificaron formas intermedias constituidas por parásitos redondeados con las posiciones relativas del DNA nuclear y el kinetoplasto, similar a la de tripomastigotes metacíclicos, con la presencia o no del flagelo. Estas formas intermedias, se clasificaron según la presencia o ausencia de flagelo como FI/+FLG o FI/- FLG, respectivamente. Tanto para los parásitos portadores del vector pTREX vacío como los que sobreexpresan TcCAL1x6His, se observó una disminución del número de tripomastigotes metacíclicos y el aumento del porcentaje de amastigotes, cuyo máximo se registró a las 12 h (Fig. 17 A). Si bien se observa una tendencia de mayor porcentaje de amastigotes en los parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His comparados con sus controles, el análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre los dos cultivos. También se calculó el porcentaje de formas intermedias que predominaron en los cultivos, las cuales se caracterizaron por una morfología redondeada y carente de flagelo externo. Sin embargo, en este caso tampoco se observaron diferencias significativas entre los cultivos (Figura 17; FI/-FLG en el gráfico de barras).

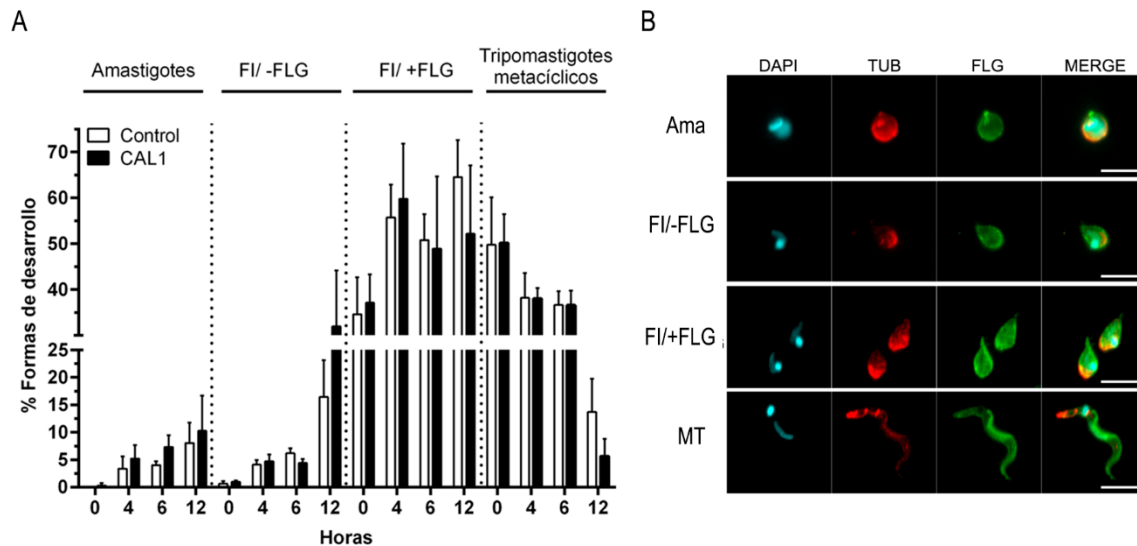


Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de TcCAL1x6His en la amastigogénesis *in vitro* de *T. cruzi*. **A.** Tripomastigotes metacíclicos de la cepa Y con el vector pTREX vacío (Control) o que sobreexpresan la proteína TcCAL1x6His (CAL1) se incubaron en medio RPMI ácido (pH 5) para inducir la amastigogénesis. Se tomaron muestras a las 4, 6 y 12 horas de incubación para contar y evaluar las diferentes formas de desarrollo del parásito. El gráfico muestra los porcentajes de las diferentes formas, amastigotes axénicos (Amas), formas intermedias sin flagelo (FI/-FLG), formas intermedias con flagelo (FI/+FLG) y tripomastigotes metacíclicos (MT). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba *t-student* (ns, *p value*>0.05). El gráfico muestra el resultado de dos experimentos independientes. **B.** Microscopía de inmunofluorescencia que muestra las diferentes formas de desarrollo encontradas durante el proceso de amastigogénesis *in vitro*. Los parásitos se marcaron con DAPI para evidenciar las posiciones relativas del DNA nuclear y el kinetoplasto. TUB y FLG indican las incubaciones con los anticuerpos anti-tubulina y Anti-PFR para evidenciar la tubulina y el flagelo, respectivamente.

3.11 Efecto de la sobreexpresión de TcCAL1x6His en la invasión a células de mamífero

Luego de estudiar el efecto de la sobreexpresión de TcCAL1x6His en la proliferación y diferenciación, se decidió explorar la capacidad infectiva de estos cultivos, específicamente en los procesos de adhesión e infección del parásito a la célula hospedadora. En primera instancia, se estudió el proceso de adhesión *in vitro* a células Vero. Para esto, se incubaron células Vero adheridas a cubreobjetos con tripomastigotes metacíclicos de la cepa Y durante 2 h, se lavaron cinco veces con pipeteo suave y se fijaron para calcular el porcentaje de células con parásitos adheridos (Fig. 18). Se encontró que el porcentaje de células con parásitos adheridos fue significativamente mayor en las células incubadas con los parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His comparados con los parásitos controles ($76.3 \pm 14.2\%$ vs $44.8 \pm 8.5\%$, respectivamente). Consistentemente, el número de parásitos adheridos cada 100 células fue significativamente mayor en las células incubadas con los parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His con respecto a los controles (859.7 ± 128 vs 296.3 ± 60.7 , respectivamente).

Con los datos obtenidos del porcentaje de células infectadas y el número de parásitos adheridos cada 100 células, se obtuvo el índice de adhesión de los parásitos. Este índice también mostró ser significativamente mayor en las células que fueron incubadas con los parásitos sobreexpresantes cuando se compararon con los controles, respectivamente (114.3 ± 45.5 vs 555.9 ± 153.4 para los cultivos TcCAL1x6His vs controles).

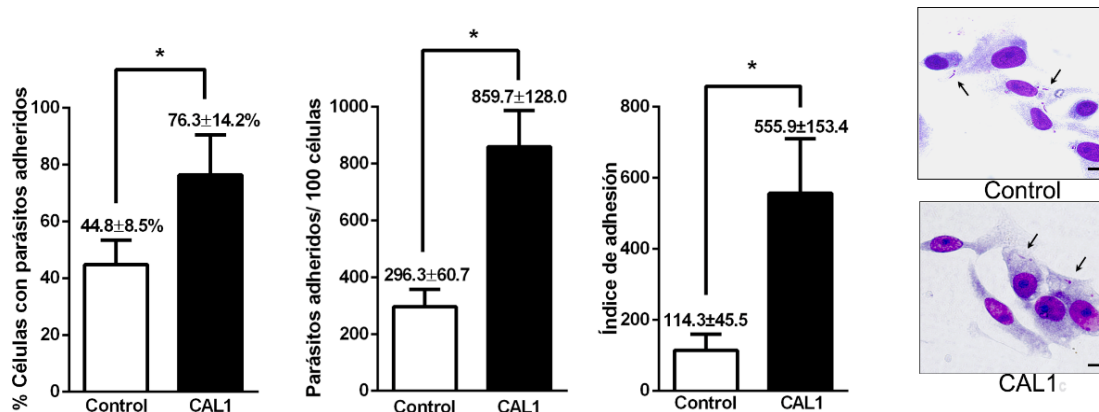


Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de TcCAL1x6His en la adhesión *in vitro* de *T. cruzi*. Tripomastigotes metacíclicos de la cepa Y portadores del vector pTREX vacío (Control) o que sobreexpresan TcCAL1x6His (CAL1), fueron incubados en una relación 300:1 parásito: célula Vero durante 2 h para calcular el porcentaje de células con parásitos adheridos, el número de parásitos adheridos cada 100 células y el índice de adhesión. Se muestran las células con parásitos adheridos de cada condición teñidos con el colorante Panoptic Colorpack, de la condición control (Control) y las células incubadas con tripomastigotes metacíclicos que sobreexpresan TcCAL1x6His (CAL1). Las flechas de color negro indican los parásitos adheridos. El análisis estadístico se realizó aplicando una prueba *t-student* **p value*<0.05. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos. Barra de escala: 10 μ m.

Luego, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de TcCAL1x6His sobre la capacidad de invadir células Vero y desarrollar amastigotes intracelulares. En este caso, los tripomastigotes metacíclicos de la cepa Y controles (portadores del vector pTREX vacío) o que sobreexpresan TcCAL1x6His, se incubaron con células Vero durante 24 h. Luego de subsecuentes lavados, los discos de infección fueron teñidos con el colorante Panoptic Colorpack para calcular el porcentaje de células infectadas, el número de amastigotes intracelulares por célula Vero y un índice endocítico (Fig. 19). Tanto para porcentaje de células infectadas como para número de amastigotes por cada 100 células infectadas, se encontró que fueron significativamente mayores en las células infectadas con parásitos que sobreexpresan TcCAL1 cuando se compararon con las células infectadas con los parásitos control ($41.2 \pm 6.2\%$ vs $18.9 \pm 5.3\%$ y $1398 \pm 83.5\%$ vs $926.3 \pm 215.2\%$, respectivamente). De igual manera, se tomaron en cuenta los valores obtenidos en el porcentaje de infección y el número de amastigotes intracelulares para

obtener un índice endocítico, indicando que los parásitos que sobreexpresan la proteína TcCAL1 recombinante tienen significativamente mayor capacidad de infección (121.9 ± 29.7 para controles vs 412.5 ± 63.2 para los parásitos TcCAL1x6His).

Para cuantificar las diferencias en los índices de adhesión y endocítico, se calculó un índice de cambio (*Fold change*) de la diferencia de esos valores el cual resultó de 3.96 y 2.21, respectivamente.

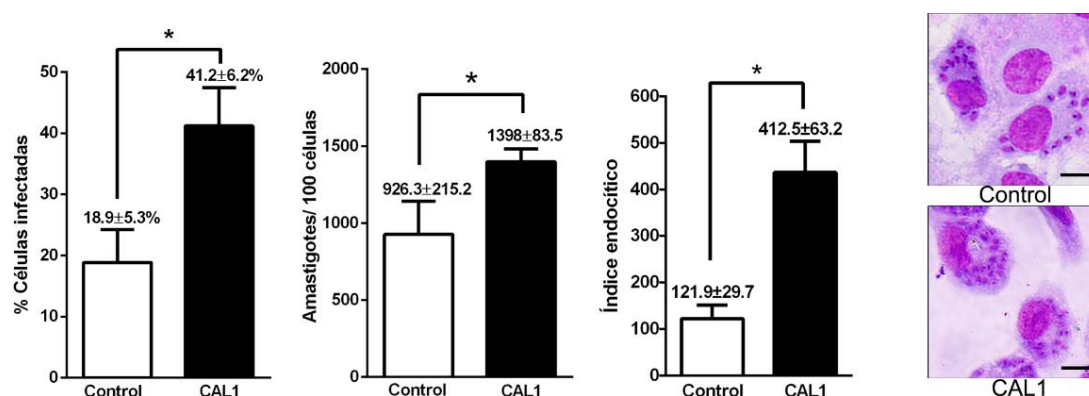


Figura 19. Efecto de la sobreexpresión de TcCAL1x6His en la invasión *in vitro* de *T. cruzi*. Tripomastigotes metacíclicos de la cepa Y portadores del vector pTREX vacío (Control) o que sobreexpresan TcCAL1x6His (CAL1), fueron incubados en una relación 300:1 parásito: célula Vero durante 24 h para calcular el porcentaje de células infectadas, el número de amastigotes intracelulares cada 100 células y el índice de endocítico obtenido. En el panel derecho, se muestran las células infectadas de cada condición teñidos con el colorante Panoptic Colorpack, de la condición control (Control) y las células incubadas con tripomastigotes metacíclicos que sobreexpresan TcCAL1x6His (CAL1). Se pueden notar los amastigotes intracelulares en cada caso. El análisis estadístico se realizó aplicando una prueba *t-student* **p value* < 0.05. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos. Barra de escala: 10 μ m.

3.12 Determinación de niveles de calcio en epimastigotes de *T. cruzi* que sobreexpresan TcCAL16xHis

Dado que una de nuestras hipótesis plantea que TcCAL1x6His une Ca^{2+} y la sobreexpresión de la proteína podría causar un secuestro y desbalance de los niveles del ion en el citosol, se decidió cuantificar los niveles de Ca^{2+} intracelular en los epimastigotes de la cepa Y y CL que sobreexpresan TcCAL1x6His. Para esto, se utilizó el indicador radiométrico Fura 2-AM para obtener valores de fluorescencia utilizando dos longitudes de onda de excitación diferentes, una a 340 nm que corresponde al indicador unido a Ca^{2+} y otra a 380 nm que corresponde al Fura libre de Ca^{2+} . Los valores de fluorescencia (*relación* 340/380 nm) se utilizaron para calcular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal mediante la ecuación de Grynkiewicz (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Para esto, se realizó la incorporación con Fura 2-AM a cultivos de epimastigotes, se sembraron en placas de 96

pocillos y se monitoreó la señal de emisión a 510 nm, tanto con la excitación de 340 como de 380, en el espectrofluorímetro *FlexStation® 3 Station*. El valor máximo de fluorescencia del sistema se alcanzó tras la adición de tritón X-100, lo que permitió la ruptura de la membrana y el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. Por otro lado, el valor mínimo de fluorescencia se registró después de la adición de EGTA para quelar la totalidad del Ca^{2+} presente en el sistema. La figura 20 A, muestra una gráfica representativa de la relación de fluorescencia 340/380 nm en respuesta a estímulos para obtener valor máximos y mínimos de fluorescencia, esperados al agregar tritón-X100 y EGTA, respectivamente. El agregado de digitonina se realizó para potenciar la permeabilización con Tritón-X100, si bien no se observó respuesta con este estímulo. En la figura 20 B, se muestra la concentración de calcio basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenida por triplicado de epimastigotes portadores del vector pTREX vacío y sobreexpresantes de TcCAL1x6His de la cepa Y. En este caso, no se obtuvieron diferencias significativas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ entre esos cultivos, en 4 experimentos independientes.

Estos ensayos también se realizaron con cultivos que sobreexpresan TcCAL1x6His de la cepa CL y sus respectivos controles. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7. Se realizaron cuatro experimentos independientes. En dos de ellos, se encontró que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tiende a ser menor en los parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His que los controles, mientras que, en los dos restantes no se encontraron diferencias significativas.

Con respecto a los niveles basales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de los parásitos *tccal1^{+/-}*, se realizaron dos experimentos que no resultaron reproducibles. Por lo tanto, se requiere repetir dichos experimentos con el fin de establecer el comportamiento de los niveles de Ca^{2+} en estos parásitos.

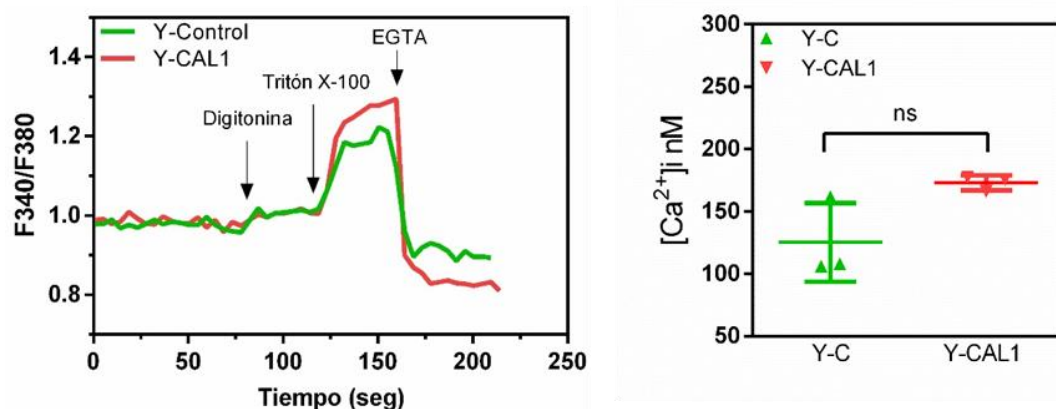


Figura 20. Determinación de $[Ca^{2+}]_i$ basal de epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His. Se utilizó Fura 2-AM para realizar medidas radiométricas de fluorescencia y calcular la $[Ca^{2+}]_i$ basal en epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His. Se utilizaron epimastigotes portadores del plásmido pTREX como control (Y-C) y epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His (Y-CAL1) de la cepa Y. Izquierda. Relación de fluorescencia 340/380 nm (F_{340}/F_{380}) de epimastigotes de la cepa Y frente a estímulos de digitonina, tritón x-100 y EGTA. Derecha. $[Ca^{2+}]_i$ basal de epimastigotes de la cepa Y. Gráfico representativo de tres experimentos independientes. Cada punto en la gráfica mostrado corresponde a una réplica técnica del experimento. Se aplicó un *t-student* test (p value=0.05) como test estadístico.

Tabla 7. Determinación de $[Ca^{2+}]_i$ de epimastigotes de la cepa CL.

Experimento	$[Ca^{2+}]_i$ nM Control>TcCAL1 ($p<0.005$)	$[Ca^{2+}]_i$ nM Control=TcCAL1($p>0.005$)
1	363.6±6 vs. 204±48	_____
2	_____	110±25 vs 142±7
3	_____	329±110 vs 378±100
4	154.6±5 vs 50.7±12	_____

La tabla 7 muestra los valores obtenidos en cuatro experimentos independientes en los cuales se obtuvieron diferentes comportamientos en cuanto a los niveles basales de $[Ca^{2+}]_i$ de cultivos de la cepa CL que sobreexpresan TcCAL1 respecto a los controles. Se aplicó un *T-student* test (p value=0.05) como prueba estadística para determinar las diferencias significativas en las $[Ca^{2+}]_i$ de cada cultivo.

PARTE III. Bioquímica y entorno molecular de TcCAL1 de *T. cruzi*

En esta parte del trabajo, se estudió la capacidad de TcCAL1 de unir Ca^{2+} así como su entorno molecular. La proteína purificada se trató para obtener una muestra predominantemente monomérica y libre de Ca^{2+} empleando β -mercaptoetanol y la resina quelante de iones divalentes Chelex®, respectivamente. Esta muestra se utilizó para analizar la unión a Ca^{2+} empleando el indicador de Ca^{2+} Quin-2 y mediante las técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular y RMN. El entorno molecular de TcCAL1 se estudió a través de ensayo de doble híbrido en levaduras y los interactores identificados que se localizaron en los parásitos mediante microscopia de inmunofluorescencia. Por último, se realizó el abordaje de los sitios de interacción de TcCAL1 con sus interactores utilizando la herramienta de predicción de interacciones proteína-proteína de AlphaFold2.

3.13 Expresión de la proteína TcCAL1 recombinante y producción de anticuerpo policlonal

Los oligonucleótidos CAL1 y CAL2 (Tabla 2), diseñados a partir de la secuencia TcCLB.507165.30, se utilizaron para obtener el gen *tcca1* mediante PCR a partir de DNA genómico de *T. cruzi* de la cepa CL (tipificada como TcII). El gen *tcca1* se clonó de forma direccional utilizando las enzimas NcoI y Sall en el vector pET22b y se obtuvo la secuencia que codifica para TcCAL1 fusionada a una etiqueta de seis histidinas (x6His) en el extremo C-terminal (TcCAL1x6His), que se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α . Luego, se confirmó la presencia del inserto *tcca1x6his* por secuenciación con un 99% de identidad con la secuencia depositada en TriTrypDB, sin cambios no conservados en la secuencia aminoacídica de TcCAL1. Posteriormente, el vector recombinante pET22b/*tcca1x6his* se utilizó para transformar bacterias *E. coli* BL21 (D3) Rosetta y sobreexpresar la proteína recombinante en condiciones estándar de inducción por adición de IPTG 1 mM.

3.14 Purificación de TcCAL1x6His con columna Ni-NTA

La proteína TcCAL1x6His fue purificada por cromatografía de afinidad utilizando resina Ni-NTA. Se analizó el perfil de expresión y de purificación a escala analítica de TcCAL1x6His. Se tomaron muestras de las diferentes etapas de la purificación que fueron sometidos a electroforesis SDS-PAGE en gel de acrilamida al 12%. (Fig. 21 A-B). La proteína TcCAL1x6His purificada mostró una banda a la altura esperada (13.6 kDa) y otra de aproximadamente el doble de peso molecular (~26 kDa). Mediante un tratamiento con un exceso de DTT, se determinó que TcCAL1x6His forma un homodímero, en estas

condiciones de expresión heteróloga, mediante la unión por puente disulfuro de sus cisteínas C-terminales (Fig. 21 C).

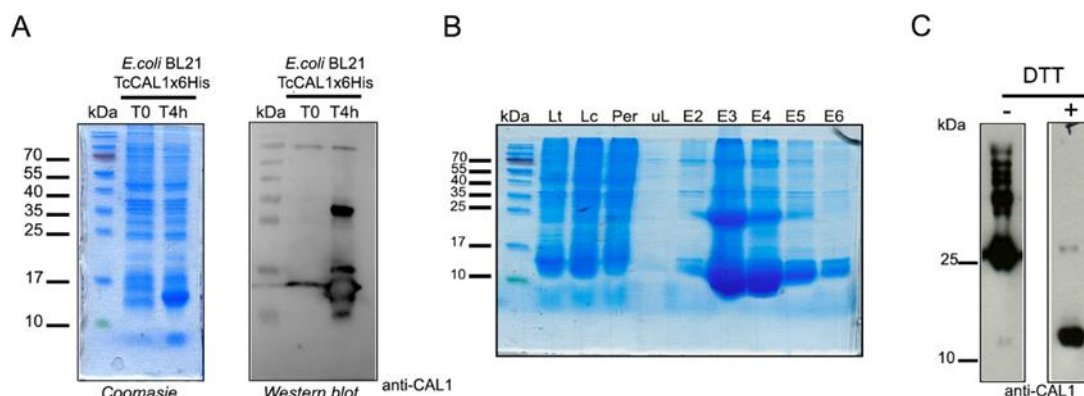


Figura 21. Expresión y purificación de TcCAL1x6His. Se indujo la expresión de TcCAL1x6His en un cultivo de *E. coli* BL21/pET22b/*tccal1* con 1 mM de IPTG durante 4 h a 37°C en agitación. **A.** Electroforesis SDS-PAGE en gel de acrilamida al 12% y teñido con *Coomassie blue* y *western blot* revelado con anti-CAL1 de lisados proteicos no inducidos (T0) y a 4 h de la inducción (T4h). **B.** Perfil de purificación de TcCAL1x6His con resina Ni-NTA. La purificación se realizó a partir de 800 ml de cultivo de *E. coli* BL21/pET22b/*tccal1* inducido. El gel de acrilamida al 12% muestra diferentes fracciones de muestras obtenidas a lo largo de la purificación. Lt, Lisado total. Lc, Lisado clarificado. Per, percolado. uL, último lavado de resina. E2-E6: eluidos 2 al 6. **C.** *Western blot* de tratamiento con DTT de TcCAL1x6His purificada. Se muestra la detección de la proteína sin (-) y con DTT añadido (+) revelado con el anticuerpo anti-CAL1. kDa: kilodalton.

3.15 Determinación de unión a Ca^{2+} por TcCAL1

Con el objetivo de comprobar experimentalmente la unión a Ca^{2+} de TcCAL1, llevamos a cabo diferentes estrategias:

Ensayos con el indicador Quin-2

El indicador Quin-2 tiene alta afinidad por Ca^{2+} y longitudes de excitación y emisión en el rango 339/492 nm, que permiten monitorear la unión a Ca^{2+} por irradiación con luz UV. Para realizar este ensayo, se utilizó un equipo de *dot blot* para inmovilizar en una membrana de PVDF a TcCAL1x6His y las proteínas calmodulina (CaM), albúmina bovina (BSA) y sorcina como controles positivos, y lisozima y la enzima invertasa como controles negativos. Luego de las incubaciones con soluciones de Quin-2 en presencia de CaCl_2 y los respectivos lavados para eliminar el exceso de indicador, la membrana se expuso a luz UV y se tomó registro de la señal emitida por cada proteína (Fig. 22). Como resultado, se observó señal de fluorescencia en los *spots* correspondientes a TcCAL1x6His (rCAL1) en las dos concentraciones empleadas y una señal débil para CaM y señales evidentes para BSA y sorcina. Mientras que los *spots* correspondientes los controles negativos, lisozima e invertasa, la señal fue muy débil o no se observó señal

de fluorescencia (Fig. 22 A). Las curvas de intensidad de fluorescencia muestran la disminución de la señal cuando las membranas se incubaron con el quelante de Ca^{2+} EGTA y Quin-2, la cual disminuyó considerablemente para rCAL1, BSA y sorcina, y fue casi imperceptible para lisozima e invertasa (Figura 22 B). En conjunto, estos resultados sugieren que TcCAL1x6His une Ca^{2+} .

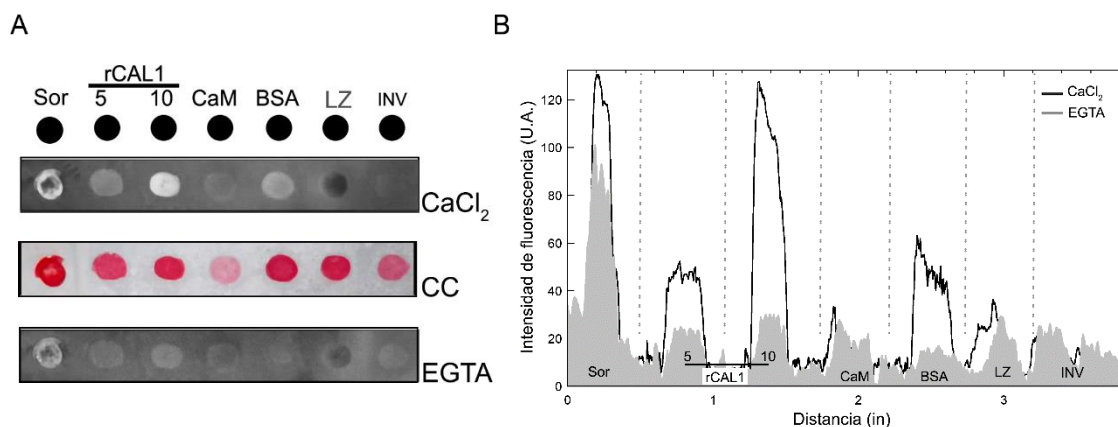


Figura 22. Ensayo de unión a Ca^{2+} por TcCAL1x6His con el indicador Quin-2. La proteína TcCAL1x6His purificada fue sembrada a una membrana de PVDF. Luego de la incubación con 1 mM de CaCl_2 y 1 mM Quin-2, se expuso a luz UV en un transiluminador. **A.** Membrana con señal de fluorescencia emitida por el Quin-2 en presencia de CaCl_2 (CaCl_2) o Luego de lavados con EGTA (EGTA). La incubación de la membrana con rojo de Ponceau se utilizó como control de carga (CC). Se muestra la señal de 5 µg de sorcina (Sor), 5 y 10 µg de TcCAL1x6His (rCAL1, 5-10), 3 µg de calmodulina (CaM), 5 µg albúmina bovina (BSA), 5 µg Lisozima (LZ) y 5 µg de la enzima invertasa (INV). **B.** Perfil de intensidad de señal de cada *spot* de proteína analizado. El eje y, refleja la intensidad de señal en cada *spot* señalado en la parte inferior. La curva de color negro y el área gris señalan la intensidad de fluorescencia del Quin-2 al incubarse con CaCl_2 y EGTA, respectivamente. El eje x, refleja la distancia en pulgadas de cada muestra en la membrana.

Tratamiento de TcCAL1x6His con β -mercaptoetanol

Previamente a los ensayos de DC y RMN, se trató la muestra con β -mercaptoetanol. El tratamiento con este agente reductor fue necesario para obtener resultados precisos sobre la estructura secundaria de la proteína y facilitar la interpretación de los datos obtenidos.

La mezcla de monómero y dímero de la proteína TcCAL1x6His purificada a partir de *E. coli* se sometió a un tratamiento con 5% (v/v) de β -mercaptoetanol por incubaciones de 15 min, una a temperatura ambiente y la otra a 45 °C, para obtener únicamente la forma monomérica. Luego del tratamiento, la solución de proteína se sometió a diálisis para eliminar las trazas del agente reductor y posterior concentración por tubos concentradores Macrosep® Advance. La Fig. 23, muestra el monitoreo de

estos procesos, en donde se puede observar la obtención mayoritaria final de la forma monomérica de TcCAL1x6His (13.6 kDa).

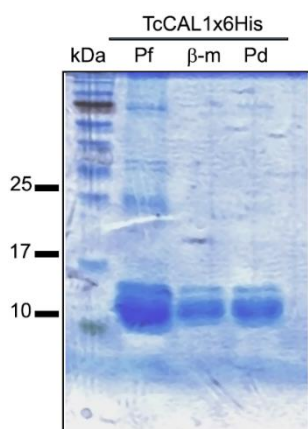


Figura 23. Tratamiento de TcCAL1x6His con β-mercaptoetanol. El tratamiento de la proteína TcCAL1x6His con β-mercaptoetanol fue seguido a través de electroforesis SDS-PAGE en gel de acrilamida al 12%. Se muestra la proteína TcCAL1xHis purificada (Pf) que se sometió a tratamiento con β-mercaptoetanol (β-m) para obtener únicamente la forma monomérica. La proteína se dializó (Pd) para obtener una muestra libre de agente reductor.

Una vez obtenidas las muestras se enviaron a analizar con las técnicas de DC y RMN en la Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabolómica (plaBEM-CONICET) del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR).

Determinación de unión a Ca^{2+} a través de dicroísmo circular (DC)

El DC es una técnica espectroscópica utilizada para analizar la estructura y la conformación de moléculas, como proteínas y ácidos nucleicos. Esta técnica permite revelar información detallada sobre la estructura secundaria de las proteínas, incluyendo la cantidad de hélices alfa, láminas beta y vueltas presentes en una proteína dada (Greenfield, 2006). Debido a que las proteínas que se unen a Ca^{2+} pueden experimentar cambios en su estructura secundaria y terciaria, utilizamos la técnica de dicroísmo para determinar si TcCAL1x6His une Ca^{2+} .

Para evidenciar cambios conformacionales en distintas condiciones se utilizaron muestras de la proteína recombinante TcCAL1x6His en presencia o ausencia de Ca^{2+} (con agregado de CaCl_2 o EGTA, respectivamente) y la muestra control formada por la proteína recombinante sin agregados. Se adquirieron espectros en el rango de luz UV cercano (250-350 nm) para registrar cambios en la estructura terciaria dada por absorción, orientación y naturaleza del ambiente circundante de aminoácidos como fenilalanina, triptófano, tirosina y cisteína (o puentes disulfuro). También, se obtuvieron espectros en el rango de luz UV lejano (<250 nm) en donde se reflejan las estructuras secundarias de las proteínas (α -hélices, láminas β , giros β y contenido desordenado) (Martin and Schilstra, 2008).

En el espectro obtenido en el rango de UV cercano se observó una ligera variación de TcCAL1x6His en ausencia de CaCl_2 (Fig. 24 A, curva naranja) respecto a

las muestras de proteína en presencia de CaCl_2 o la proteína control (Fig. 24 A, curvas celeste y verde, respectivamente). En el rango 275–282 nm los residuos mayormente detectables son triptófano (Trp) y tirosina (Tyr). Sin embargo, TcCAL1 no posee residuos de Trp, con lo cual, las variaciones corresponderían a la elipticidad molar de los residuos de Tyr únicamente. También, se obtuvieron espectros en el rango de luz UV lejano, en el cual se puede observar un ligero desplazamiento en la curva obtenida para TcCAL1x6His en ausencia de Ca^{2+} (Fig. 24 B, curva naranja), con respecto a la proteína en presencia de calcio o la muestra control (curvas celeste y verde, respectivamente). El comportamiento observado en las tres muestras analizadas es el típico para una proteína formada por α -hélices: banda negativa con dos picos a 208 y 222 nm y una banda positiva intensa a 191-193 nm (Fig. 24 B).

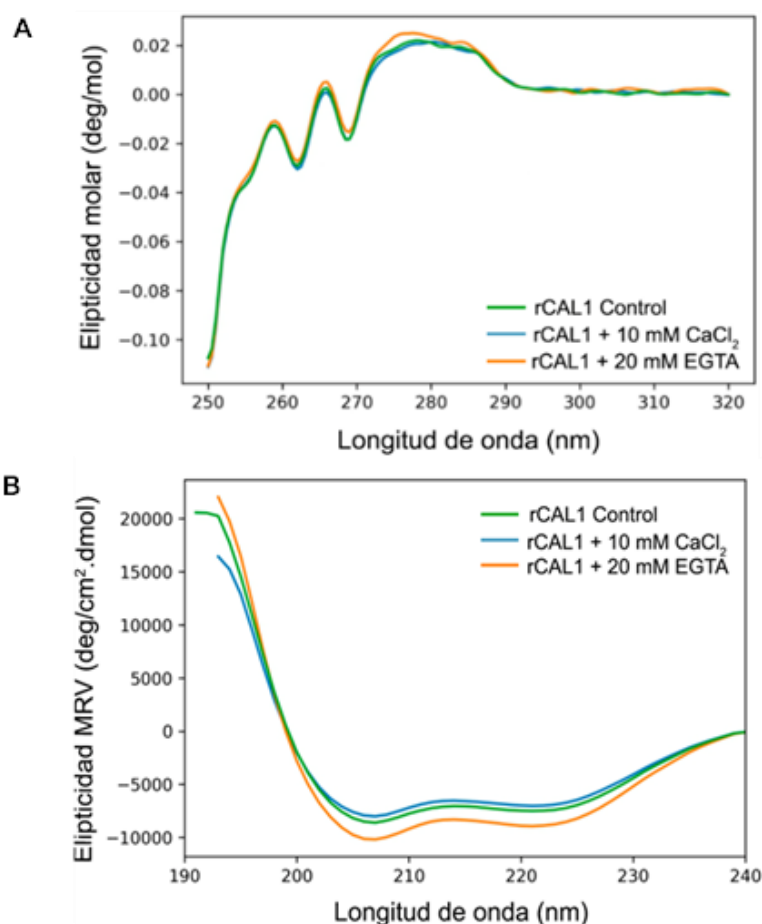


Figura 24. Espectros de DC de TcCAL1x6His. **A.** Espectro DC en UV-cercano de TcCAL1x6His para estudiar cambios en la estructura terciaria. En el rango 275–282 nm se detectó la elipticidad molar aportada por residuos de Trp y Tyr en la muestra. **B.** Espectro DC en UV-lejano para analizar la estructura secundaria de TcCAL1x6His. Se detectó la absorción típica de proteínas con α -hélices el rango de 208 y 222 nm y 191-193 nm. Se utilizó TcCAL1x6His en ausencia de calcio (rCAL1 + 20 mM EGTA), en presencia de 10 mM de CaCl_2 (rCAL1 + 10 mM CaCl_2) y la proteína sin agregados (rCAL1 Control).

Con el objetivo de obtener diferencias significativas, en los espectros de las muestras analizadas por DC, se analizó la proteína TcCAL1x6His tratada con la resina Chelex®. Esto último, para asegurarnos de eliminar cationes divalentes, entre ellos los iones Ca^{2+} presentes en la muestra. La solución de proteína recombinante monomérica se trató con la resina Chelex®, como se describe en la sección *materiales y métodos*. Dado que el pasaje por la columna diluye la muestra, esta se concentró por medio de tubos concentradores Macrosep® Advance. La proteína obtenida se analizó por *SDS-PAGE* para comprobar la presencia del estado monomérico luego del tratamiento con la resina y de su concentración (Fig. 25).

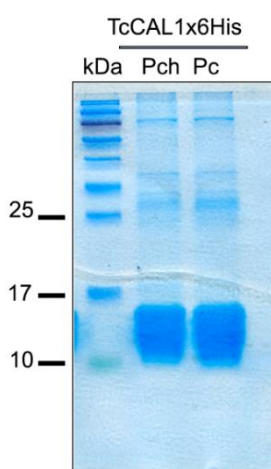


Figura 25. Tratamiento de TcCAL1x6His con la resina Chelex®. La proteína TcCAL1x6His monomérica se trató con la resina Chelex® (Pch) para eliminar los cationes divalentes. Después del tratamiento, la proteína se concentró (Pc) para su uso en análisis posteriores. Una muestra de la proteína obtenida se visualizó a través de electroforesis *SDS-PAGE* en gel de acrilamida al 12% para verificar la presencia predominante de la forma monomérica. kDa: Kilodalton

Con la proteína obtenida luego del tratamiento con la resina Chelex® y un incremento de la concentración de agente quelante con respecto al primer ensayo (100 mM vs 20 mM de EGTA, respectivamente), se adquirieron nuevos espectros de DC en UV-cercano y lejano. En estos ensayos, el espectro de DC en UV-cercano obtenido mostró un ligero desplazamiento de la curva de TcCAL1x6His en ausencia de CaCl_2 (Fig. 26 A, curva naranja), en comparación con los espectros obtenidos para las condiciones en presencia de CaCl_2 o la muestra control, sin agregados de calcio o EGTA (Fig. 26 A, curvas celeste y verde, respectivamente). Estas diferencias coinciden con las observadas entre las longitudes de onda de 270-290 nm en los espectros adquiridos antes del tratamiento de la proteína con Chelex® (Fig. 24 A). Por otro lado, en el espectro UV-lejano no se observaron diferencias en las dos condiciones evaluadas (TcCAL1x6His en presencia y ausencia de CaCl_2) respecto al control (Fig. 26 B).

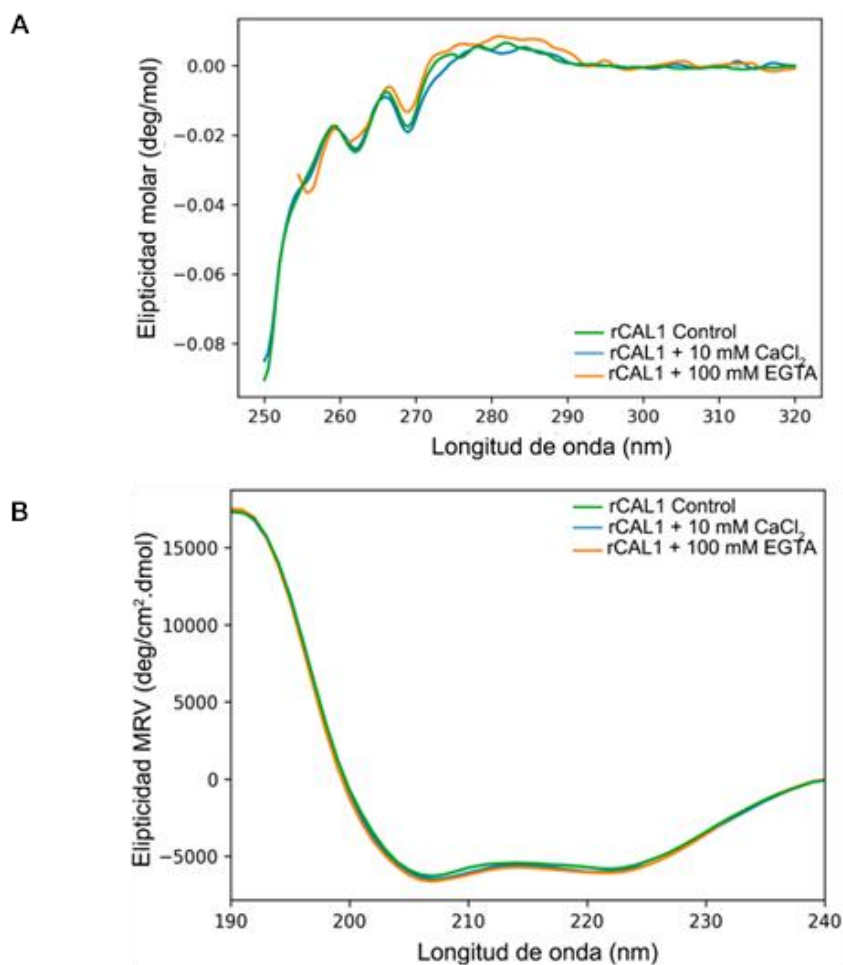


Figura 26. Espectros de CD de TcCAL1x6His monomérica tratada con Chelex®. **A.** Espectro DC en UV-cercano de TcCAL1x6His monomérica tratada con Chelex® para estudiar cambios en la estructura terciaria. En el rango 275–282 nm se detectó la elipticidad molar aportada por residuos de Trp y Tyr en la muestra. **B.** Espectro DC en UV-lejano para analizar la estructura secundaria de TcCAL1x6His. Se detectó la absorción típica de proteínas con α -hélices el rango de 208 y 222 nm y 191-193 nm. Se utilizó TcCAL1x6His en ausencia de calcio (rCAL1 + 100 mM EGTA), en presencia de 10 mM de CaCl₂ (rCAL1 + 10 mM CaCl₂) y la proteína sin agregados (rCAL1 Control).

Ensayos de Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los análisis por RMN pueden ser utilizados para obtener información completa acerca de la estructura de proteínas. Las interacciones de proteínas con otras moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, péptidos y ligandos) también pueden ser estudiados a través de esta técnica, la cual es capaz de detectar los cambios químicos (*chemical shift*, δ) dentro de una proteína con o sin su componente de interacción. De esta manera, se pueden obtener espectros de RMN de protones (¹H-RMN) para realizar la identificación de las señales de resonancia (picos) y la deducción de información sobre los protones

presentes en una molécula frente a los cambios dados por su interacción con un ligando. En un espectro de una dimensión 1D ^1H -RMN están bien establecidas las regiones en las que se pueden identificar grupos funcionales. Específicamente, para el estudio de proteínas, los protones que mayoritariamente experimentan en cambios en la resonancia son los dados por los grupos de amidas dentro del enlace peptídico ($\delta = 5.5\text{-}8.5$ ppm) y los grupos metilos ($\delta = 0.5\text{-}1.5$ ppm).

Con el objetivo de confirmar la unión de Ca^{2+} a TcCAL1x6His mediante este enfoque, se realizó análisis de ^1H -RMN de TcCAL1x6His en condiciones que podrían inducir cambios conformacionales en la proteína y que serían detectados como modificaciones en la resonancia de los protones (^1H) de los grupos amidas y metilos, utilizando las mismas muestras y en similares condiciones que las empleadas para los ensayos de DC. Para las muestras tratadas con β -mercaptoetanol, se obtuvieron espectros para las regiones metilos y amidas (Fig. 27). En el eje X, se muestra el *chemical shift* (δ) expresado en ppm que corresponde a un grupo funcional determinado (amida o metilo) y el eje Y corresponde a la intensidad de señal. El área bajo la curva en el eje Y, es proporcional al número de núcleos de ^1H en la molécula con el mismo *chemical shift* (δ). En los espectros obtenidos, se pueden observar incrementos sutiles en la intensidad de señal de ^1H en la proteína en ausencia de calcio con respecto a TcCAL1x6His en condiciones saturadas de este ion. Este comportamiento se observó tanto en el espectro de metilos como de amidas lo que podría indicar que la proteína experimenta ligeros cambios conformacionales al unirse a Ca^{2+} , sin embargo, esto último no puede confirmarse con estas condiciones.

Los ensayos de RMN se repitieron con la proteína TcCAL1x6His tratada con Chelex®. Esto último, para asegurarnos de eliminar los iones Ca^{2+} presentes en la muestra y de esta manera poder detectar intensidades de señal más evidentes al comparar la proteína con agregado de CaCl_2 . La solución de proteína recombinante monomérica, al igual que para DC, se trató con la resina Chelex® y un incremento la concentración de agente quelante con respecto al primer ensayo (100 mM vs 20 mM de EGTA, respectivamente). Las muestras se analizaron a través de ^1H -RMN. Los espectros adquiridos muestran un comportamiento similar al descrito anteriormente para la proteína sin el tratamiento con la resina Chelex® y con 20 mM de EGTA. Se observan incrementos en la intensidad de señal en la zona de metilos ($\delta = 0.5\text{-}1.5$ ppm) en ausencia de Ca^{2+} con respecto a la curva de la proteína en condiciones saturadas de Ca^{2+} (Fig. 28 A). Por otro lado, la mayoría de los incrementos sutiles en la intensidad de señal se

observó en la zona de amidas y cadenas laterales aromáticas (7-8 ppm) en el espectro obtenido para la zona de amidas (Fig. 28 B). En consecuencia, con este abordaje no se pudo confirmar de manera precisa la asociación de TcCAL16xHis al Ca^{2+} .

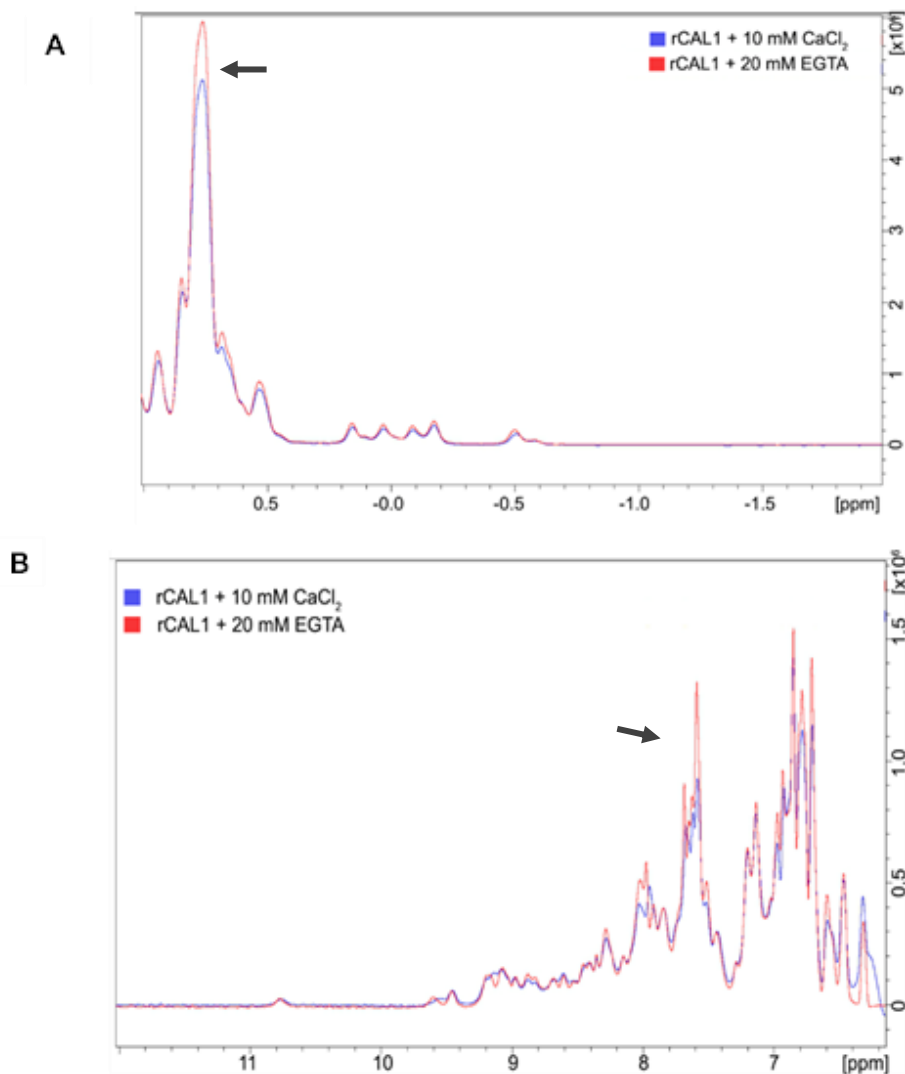


Figura 27. Espectros de ^1H -RMN de TcCAL1x6His. **A.** Espectro ^1H -RMN en zona de metilos de TcCAL1x6His ubicado en la zona de desplazamiento químico $\delta = 0.5\text{--}1.5$ ppm. **B.** Espectro ^1H -RMN en zona de amidas de TcCAL1x6His en la zona de desplazamiento químico $\delta = 7\text{--}8$ ppm. Se utilizó TcCAL1x6His en ausencia de calcio (rCAL1 + 20 mM EGTA) y en presencia de 10 mM de CaCl_2 (rCAL1 + 10 mM CaCl_2). Los cambios en la intensidad de señal cada grupo funcional (amida o metilo) se encuentran señalados con flechas.

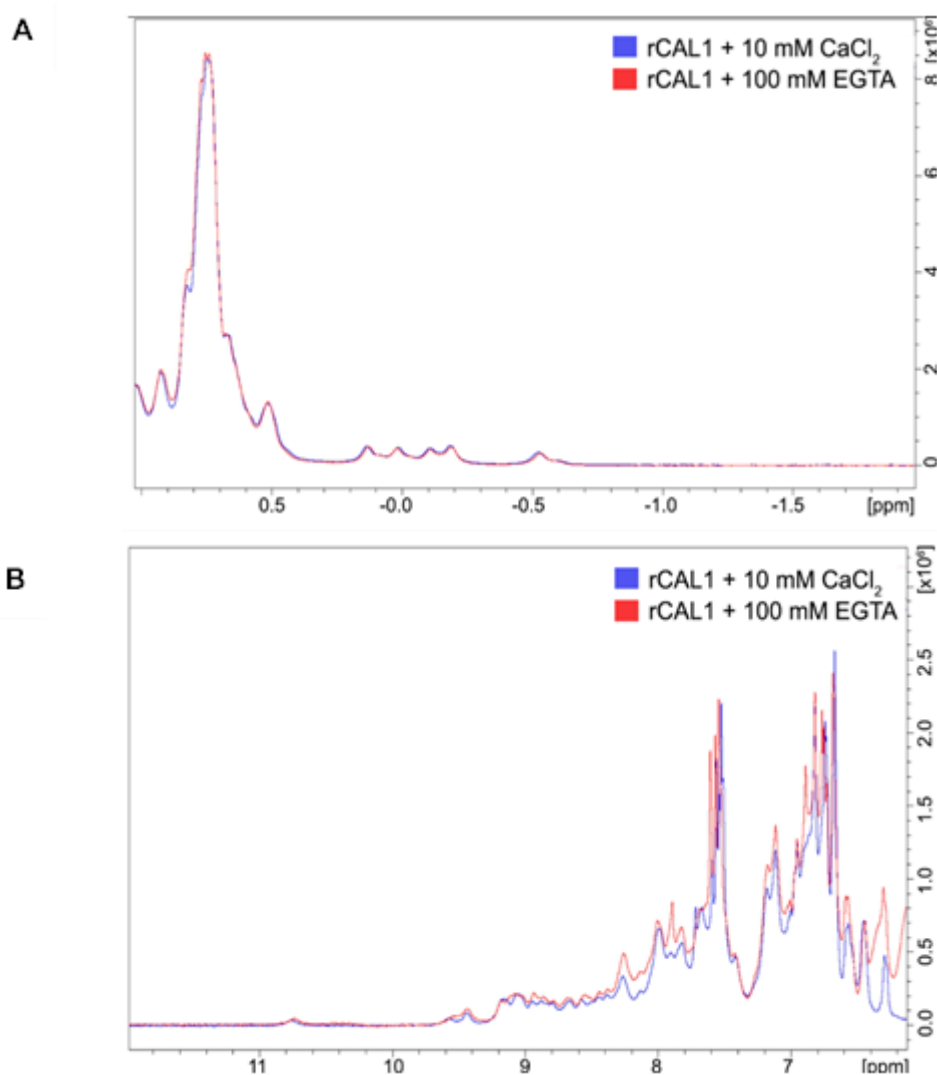


Figura 28. Espectros de ¹H-RMN de TcCAL1x6His tratada con Chelex®. **A.** Espectro ¹H-RMN en zona de metilos de TcCAL1x6His ubicado en la zona de desplazamiento químico $\delta = 0.5-1.5$ ppm. **B.** Espectro ¹H-RMN en zona de amidas de TcCAL1x6His en la zona de desplazamiento químico $\delta = 7-8$ ppm. Se utilizó TcCAL1x6His en ausencia de calcio (rCAL1 + 100 mM EGTA) y en presencia de 10 mM de CaCl₂ (rCAL1 + 10 mM CaCl₂).

3.16 Estudio de modificación por palmitoilación de TcCAL1

La técnica de intercambio acil-biotina (ABE, por sus siglas en inglés) se realizó con el fin de determinar si TcCAL1 puede palmitoilarse como modificación postraduccional y confirmar la predicción realizada por el software CSS-Palm 4.0. Se partió de un lisado de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa CL *wild type* que se sometió a tratamiento para la sustitución de los grupos S-acilo por biotina. En este método, las cisteínas libres fueron bloqueadas con N-etilmaleimida (NEM) y la muestra se dividió en dos mitades. Una mitad de la muestra se trató con hidroxilamina neutra para eliminar los grupos S-acilo (+HA) y las cisteínas expuestas fueron marcadas con biotina. Las

proteínas biotiniladas se purificaron utilizando una resina de agarosa-estreptavidina. La otra mitad de la muestra se procesó sin tratamiento de hidroxilamina (-HA) y se purificó de la misma manera. En el análisis por *western blot*, se observó la presencia de una banda a la altura esperada para TcCAL1 (~12 kDa) en los lisados tratados con hidroxilamina (+HA), mientras que no se detectó señal en la muestra -HA (Fig. 29). Estos resultados sugieren que ambas o una de las cisteínas presentes en TcCAL1 son factibles de ser palmitoiladas.

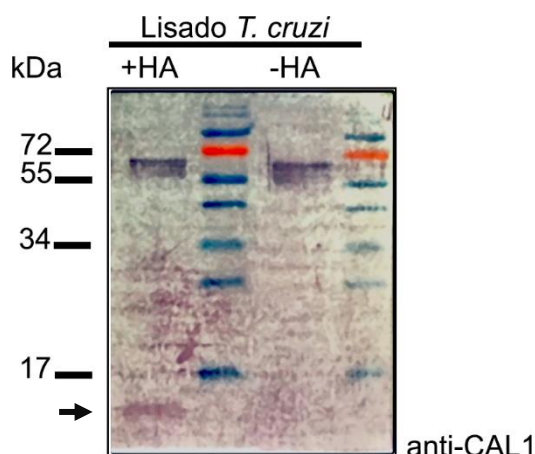


Figura 29. Determinación de palmitoilación de TcCAL1 de *T. cruzi*. Análisis por *western blot* de muestras de lisados proteicos de epimastigotes de la cepa CL de *T. cruzi*. Las muestras sometidas al procedimiento de intercambio acil-biotina (ABE), tratadas con hidroxilamina (+HA) o sin tratar (-HA), se purificaron a través de una resina de agarosa-estreptavidina. Las muestras resultantes se analizaron mediante *western blot* revelado con el anticuerpo anti-TcCAL1 (anti-CAL1). La banda correspondiente a TcCAL1 (~12 kDa) se indica con una flecha de color negro. Notar la señal inespecífica obtenida para ambas muestras a la altura de ~63 kDa).

3.17 Identificación de proteínas de unión a TcCAL1 en ensayo de doble híbrido en levaduras.

Para identificar posibles interactores de TcCAL1 y de esta manera explorar el entorno molecular que TcCAL1 pudiera tener, se realizó un ensayo de doble híbrido en levaduras. Para esto, se transformaron levaduras *S. cerevisiae* que expresan TcCAL1 con una biblioteca de cDNA de epimastigotes de *T. cruzi* clonada en el vector de expresión pVP16, y se identificaron posibles clones de interacción por selección con dos genes reporteros.

Obtención de levaduras pBTM116/TcCAL1 y ensayos de autoactivación

Como primer paso, se obtuvieron levaduras que expresan TcCAL1 fusionada al dominio *BD* de unión al DNA del factor de transcripción LexA. Para esto, se amplificó por

PCR la secuencia que codifica para *tccal1* utilizando como molde el plásmido pET22/*tccal1x6his* y los oligonucleótidos CALBTM1 y CALBTM2, y se clonó en el vector de expresión de levaduras pBTM116.

Una vez obtenido el plásmido recombinante pBTM116/*tccal1x6his*, se purificó y se usó para transfectar levaduras L40. Los clones de levaduras recombinantes se seleccionaron por crecimiento en placas con medio SD agar en ausencia de uracilo (U), lisina (K) y triptófano (W) (SD-WUK). Las dos primeras auxotrofías las confiere la levadura, mientras que la capacidad de crecer en ausencia de triptófano es conferida por el vector pBTM116. Los clones obtenidos se analizaron por *western blot* sobre lisados de levaduras crecidas en medio SD-WUK. La figura 30 A, muestra un resultado representativo de dos clones elegidos al azar (C5 y C6) de levaduras L40 recombinantes para el vector pBTM116/*tccal1x6his* (L40/TcCAL1-LexA) utilizando el suero anti-CAL1 y el anticuerpo anti-LexA. En ambos casos, se observó una señal a la altura esperada de ~37,5 kDa para la proteína TcCAL1x6His (12.5 kDa) fusionada al dominio BD de LexA (~23 kDa), confirmando la expresión de la proteína de fusión TcCAL1-LexA.

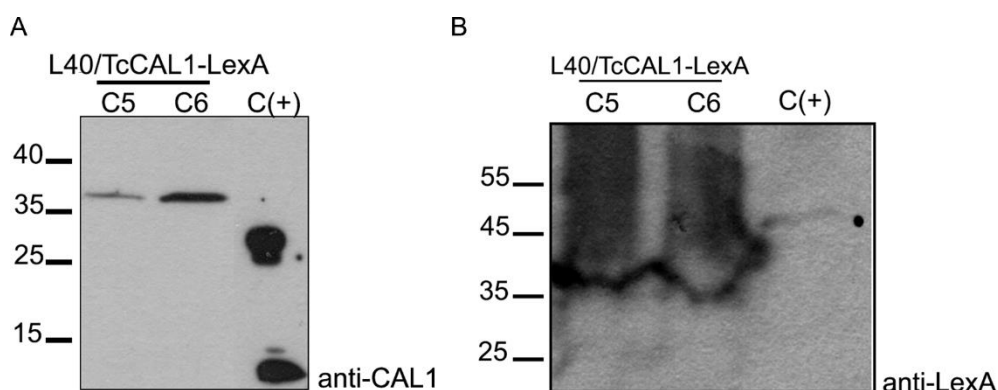


Figura 30. Análisis de expresión de TcCAL1x6His de levaduras L40/TcCAL1-LexA. **A.** Expresión de TcCAL1x6His de dos clones de levaduras L40/TcCAL1-LexA mediante *western blot* revelados con el anticuerpo anti-CAL1. **B.** Expresión de LexA de dos clones de levaduras L40/TcCAL1-LexA mediante *western blot* revelado con un anticuerpo anti-LexA. La banda de ~37,5 kDa detectada en las colonias C5 y C6 corresponden a la TcCAL1x6His (~12.5 kDa) fusionada a la proteína LexA (~23 kDa). Se detectaron 2 bandas correspondientes a monómero (~12.5 kDa) y dímero (~26 kDa) de TcCAL1x6His en el extracto proteico de bacterias portadoras del vector recombinante pET22b/*tccal1x6his* usado como control positivo (A) y se detectó una banda que corresponde de la proteína fusión Lamina-LexA (Lamina=18 kDa y LexA= 23 kDa) en extracto proteico de levaduras transformadas con el vector pBTM116/*lamina-LexA* usado como control positivo (B).

Luego, se analizó la posibilidad de que la proteína fusión TcCAL1-LexA pueda activar *per se* la transcripción del gen *his3* (que confiere auxotrofia a histidina) en presencia del dominio de activación VP16 (producto de expresión del vector pVP16 sin

inserto), en ausencia de una proteína específica de interacción con TcCAL1. Para esto, se transformaron levaduras L40/TcCAL1-LexA con el vector pVP16 (L40/TcCAL1-pVP) que contiene la secuencia del gen *leu2*, el cual que confiere la auxotrofia para leucina (L) y se seleccionaron transformantes en placas SD-WUKL. Se estriaron algunos de estos clones en placas SD-UK, SD-WUK y SD-WUKH y se incubaron a 30 °C por 48 h. El resultado esperable era que las levaduras L40/TcCAL1-pVP pudieran crecer en el medio SD-UK o SD-WUK, pero no en placas SD-WUKH. Sin embargo, observamos que estas levaduras eran capaces de crecer en placas en ausencia de histidina, SD-WUKH (Fig. 31). Este resultado muestra que TcCAL1-LexA es capaz de restaurar por si sola el factor de transcripción híbrido con VP16 vacío y activar el sistema, promoviendo la transcripción del gen *his3*.

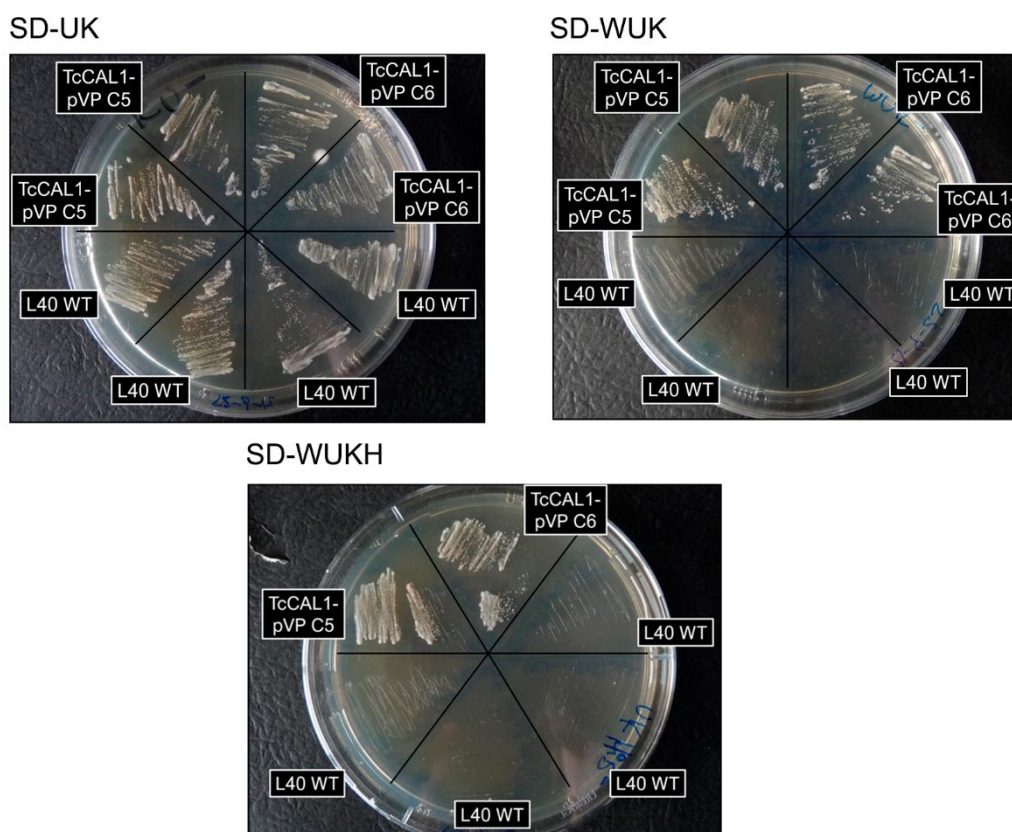


Figura 31. Ensayo de autoactivación mediante análisis de auxotrofías. Se estriaron dos clones de levaduras L40/TcCAL1-pVP (TcCAL1-pVP) y L40 *wild type* (WT) en placas de medio SD agar -UK, -WUK, y -WUKH para analizar las auxotrofías. Se observó crecimiento de los dos clones de levaduras L40/TcCAL1-pVP en las tres placas SD, sugiriendo auxotrofia para histidina por activación de la transcripción del gen *his3* por TcCAL1. Las levaduras L40 WT usadas como control crecieron únicamente en medio SD-UK. C5: clon 5, C6: clon 6.

A a partir de estos resultados, se decidió utilizar el compuesto 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) en los medios de selección del ensayo de doble híbrido. Este compuesto funciona como un inhibidor específico de la enzima imidazol glicerol fosfato deshidratasa,

codificada en el gen *HIS3* y capaz de bloquear la auxotrofia de histidina. Al agregar este inhibidor a los medios, la actividad residual inespecífica de *his3* por acción de TcCAL1 es eliminada, con el consecuente bloqueo del crecimiento de las levaduras. La principal desventaja del empleo del 3-AT es la posibilidad de perder interacciones positivas débiles que pudieran existir entre TcCAL1 y algunas secuencias peptídicas codificadas por la biblioteca de cDNA.

Para determinar la concentración mínima de 3-AT que permite recuperar la auxotrofia a histidina, se seleccionaron dos clones de las levaduras recombinantes L40/TcCAL1-pVP, se crecieron en medio líquido SD-WUKL y finalmente, se sembraron distintas diluciones en placas SD-WUKLH en presencia de concentraciones crecientes de 3-AT. Se determinó que la concentración mínima de 3-AT que inhibe la auxotrofia para histidina es 25 mM (tabla 8). En ensayos de *western blot*, se confirmó que las levaduras L40/TcCAL1-pVP expresaban la proteína de fusión TcCAL1-LexA (Fig. 32). En consecuencia, el ensayo de doble híbrido se realizó utilizando en todas las placas una concentración de 25 mM de 3AT.

Tabla 8. Ensayo de crecimiento de levaduras L40/TcCAL1-pVP en 3-AT.

SD -WUKL +3AT mM	Días de crecimiento					
	4	5	6	7	8	11
0	++	++	+++	+++	+++	+++
5	++	++	+++	+++	+++	+++
10	++	++	+++	+++	+++	+++
25	++	++	+++	+++	+++	+++
SD -WUKLH +3AT mM	4	5	6	7	8	11
0	++	++	+++	+++	+++	+++
5	++	++	+++	+++	+++	+++
10	+	+	++	++	++	++
25	-	2 col.	9 col.	9 col.	9 col. + microcol.	9 col. ++microcol.

Se monitoreó el crecimiento levaduras L40/TcCAL1-pVP en placas de SD agar -WUKL y SD -WUKLH en presencia de 5, 10 y 25 mM de 3-AT durante 11 días. Se observó crecimiento de colonias en todas las concentraciones de 3-AT empleadas en medio SD agar -WUKL, mientras que, en medio agar SD agar -WUKLH el crecimiento comenzó a disminuir a una concentración de 10 mM de 3-AT y hubo muy poco crecimiento a 25 mM de 3-AT. crecimiento abundante: +++, leve: ++, escaso: +. Col.: colonias, microcol.: microcolonias.

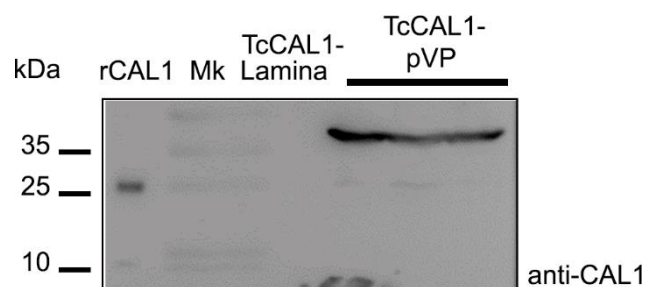


Figura 32. Western blot de levaduras L40/TcCAL1-pVP luego del crecimiento con 25 mM de 3-AT. Se realizó el análisis de la expresión de TcCAL1 en levaduras L40/TcCAL1-pVP (TcCAL1-pVP) que fueron crecidas en placas de medio SD agar -WUKH en presencia de 25 mM de 3-AT para inhibir la auxotrofia a histidina. Se detectó una banda de ~37.5 kDa correspondiente a TcCAL1 (proteína de fusión TcCAL1-LexA) con el anticuerpo anti-CAL1 en los extractos proteicos de TcCAL1-pVP. Se utilizó un extracto de levaduras TcCAL1-Lamina como control negativo y la proteína TcCAL1 recombinante de bacterias como control positivo (rCAL1).

Transformación de levaduras L40 TcCAL1-LexA con biblioteca de cDNA de T. cruzi

Se realizó una transformación a gran escala por el método de LiAc de levaduras L40/TcCAL1-LexA con una biblioteca de cDNA de epimastigotes de la cepa CL Brener, clonada en el vector pVP16. Las levaduras transformadas se seleccionaron en medio de cultivo líquido SD-WHULK (para seleccionar la biblioteca de cDNA clonada en el vector pVP16) durante 16 h. Luego, este cultivo se creció en placas de SD-WHULK en presencia de 25 mM de 3-AT. Estas placas se incubaron por 72 h y se obtuvieron 112 colonias capaces de crecer en ausencia de histidina (His⁺). Paralelamente, se realizaron controles de levaduras L40 WT transformadas con la biblioteca de cDNA y con el plásmido pVP16 para corroborar la ausencia de crecimiento en ausencia de histidina.

Posteriormente, se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa (β -gal) en los 112 clones obtenidos, segundo gen reportero de este ensayo. Para esto, se transfirieron las colonias a filtros de nitrocelulosa, se lisaron a -70 °C y se incubaron con el sustrato X-Gal. Se monitoreó el desarrollo de color azul a distintos tiempos, desde los 30 minutos hasta ON (Fig. 33).

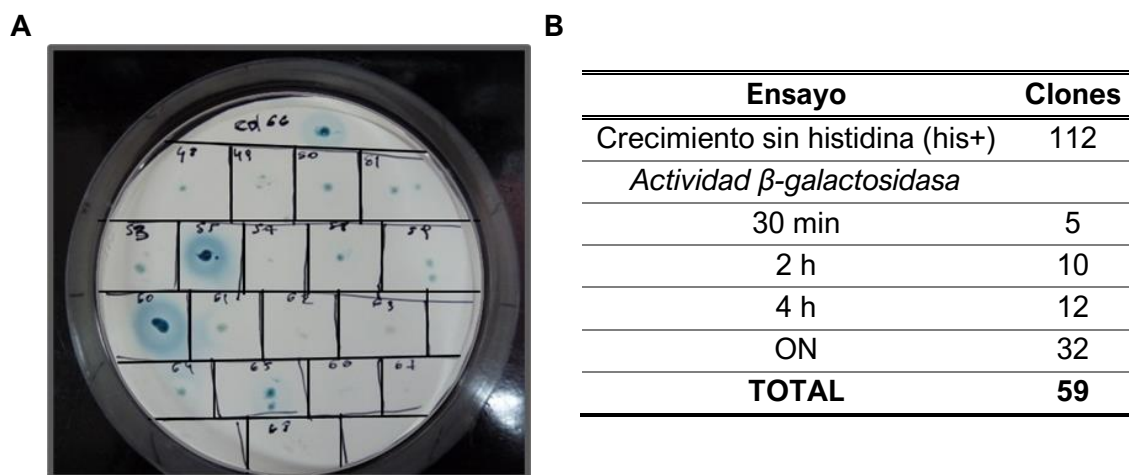


Figura 33. Ensayos de β-galactosidasa. **A.** Foto representativa del desarrollo de color azul en los clones positivos para el ensayo de β -gal. Se transfirieron colonias de levadura en placas SD-WHULK a una membrana de nitrocelulosa. Las células se lisaron a -70°C y se incubó la membrana sobre un papel con Buffer Z + X-Gal. Se muestra un ensayo representativo, colonias 48 a 68, de 112 colonias que crecieron en presencia de histidina. **B.** Tabla de seguimiento de clones his+ con actividad β-gal monitoreada por un período de 30 min hasta ON.

Se seleccionaron 27 clones his+ que desarrollaron color azul (β-gal⁺) en el periodo desde los 30 min hasta un máximo de 4h, para su posterior análisis por secuenciación. Para esto, se realizaron reacciones de PCR de colonias de levaduras utilizando los oligonucleótidos pVP16F y pVP16R. Los fragmentos obtenidos se purificaron y se enviaron a secuenciar a Macrogen y las secuencias obtenidas se analizaron por BLASTn. Como resultado, 16 secuencias presentaron identidad con genes de RNA ribosomales o sin identidad con algún gen, 6 secuencias correspondieron al plásmido pVP16 vacío y las 5 secuencias restantes presentaron identidad con dos genes distintos, codificantes para proteínas de *T. cruzi* (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de secuencias obtenidas en el doble híbrido

Secuencias obtenidas	Número de clones
Genes de RNA ribosomal	16
pVP16 Sin inserto	6
Secuencias codificantes de genes de <i>T. cruzi</i>	5

3 secuencias con Nro. de acceso: [XM 816474.1](#)

2 secuencias con Nro. de acceso: [XM 813716.1](#)

Las secuencias presentaron 100% de identidad con genes que codifican para dos proteínas hipotéticas no caracterizadas de *T. cruzi*:

- XM_813716.1 *ARM-like helical domain-containing protein* (representado en 2 secuencias): Presenta identidad con un marco abierto de 3231 pb de longitud, que codifica para una proteína de 1076 aminoácidos (número de acceso en TriTrypDB: TcCLB.511421.200). Presenta repeticiones de tipo armadillo, por lo que se denominó TcARM. La secuencia identificada en el ensayo de doble híbrido fue de 900 pb y corresponde con los 300 aminoácidos del extremo C-terminal. El análisis de esta proteína en Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/UniProt/Q4DWP4/>) predice una topología no citoplásmica (extracelular o secretada) entre los aminoácidos 1 al 848, un dominio transmembrana entre los aminoácidos 849 al 866 y una región citoplasmática en la región c-terminal desde el aminoácido 867 al 1076 (Ver anexo).
- XM_816474.1 *Prefoldin family, sub unit 4 chaperone complex* (representado en 3 secuencias): Presenta identidad una secuencia nucleotídica de 375 pb de longitud que codifica para una proteína de 125 aminoácidos (número de acceso en TriTrypDB: TcCLB.506925.190). El análisis de dominios mostró que la proteína pertenece a la familia de prefoldinas. La secuencia obtenida en el ensayo de doble híbrido corresponde al total de la secuencia de esta proteína a la cual se le asignó el nombre de TcPFD.

Ensayos de interacción específica

Para comprobar que la auxotrofia por histidina y la actividad β -gal no se deba a una activación de los genes reporteros por las posibles interacciones TcARM o TcPFD expresadas en las levaduras, se llevó a cabo un ensayo de interacción específica. Para esto, los clones provenientes del ensayo de doble híbrido se crecieron por pasajes sucesivos en placas SD-UKL en presencia de triptófano, para promover la pérdida del plásmido pBTM116/TcCAL1-LexA y retener únicamente de los plásmidos pVP16/TcARM o pVP16/TcPFD. Una vez que se comprobó la pérdida del plásmido pBTM116/TcCAL1-LexA, estos clones se transformaron con el plásmido pBTM116/Lamina. De este modo, se obtuvieron levaduras L40- pBTM116/Lamina- pVP16/TcARM o TcPFD a la que se evaluó la capacidad de crecimiento en ausencia de histidina y la actividad β -galactosidasa.

Como resultado, se comprobó que levaduras Lamina-TcARM y Lamina-TcPFD (portadoras de los plásmidos pBTM116/Lamina-pVP16/TcARM o TcPFD) fueron

incapaces de crecer en medio sin histidina (SD-WLH) así como tampoco presentaron actividad β -galactosidasa (Fig. 34). Esto sugiere que la activación de los genes reporteros, *his3* y *LacZ*, son debido a la interacción específica de TcCAL1 con sus proteínas de unión y no proveniente de activación *per se* mediada por las proteínas TcARM o TcPFD.

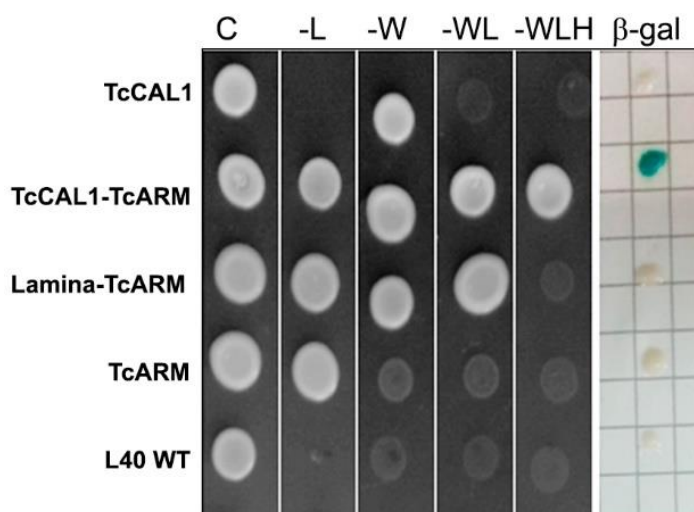


Figura 34. Ensayo de interacción específica de los clones obtenidos por doble híbrido para TcCAL1. Se analizaron colonias de levaduras L40 TcCAL1-LexA (TcCAL1), pBTM16/TcCAL1-pVP16/TcARM (TcCAL1-TcARM), pBTM116/Lamina-pVP16/TcARM (Lamina-TcARM), pVP16/TcARM (TcARM) y L40 wild type (L40 WT). Las colonias obtenidas se crecieron en medio completo SD (C), -L, -W, -WL y -WLH. Se analizó la actividad β -galactosidasa (β -gal) de las colonias. Las levaduras TcCAL1-TcARM, presentaron actividad β -galactosidasa (colonia azul) y la capacidad de crecer en medio sin histidina (SD-WLH). Los controles negativos TcCAL1, TcARM y L40 WT no mostraron crecimiento en el medio SD -WLH y tampoco presentaron actividad β -galactosidasa (colonias blancas). Se muestra un ensayo representativo con la secuencia que codifica para TcARM.

3.18 Estudios de co-localización de TcCAL1 con sus pares de interacción

A partir de DNA genómico de epimastigotes de *T. cruzi*, se obtuvieron los fragmentos correspondientes a los genes que codifican para las proteínas de unión de TcCAL1 identificadas por doble híbrido. Este trabajo formó parte de la Tesis de Licenciatura de la Lic. María José Ferrer. Brevemente, se utilizaron los oligonucleótidos específicos Pfd1 y Pfd2 o Arm1 y Arm2 para amplificar por PCR los fragmentos que codifican para la proteína TcPFD o para los 300 aminoácidos localizados en el extremo C-terminal de TcARM, ambos fusionados a una etiqueta de HA (TcPFD-HA y TcARM₃₀₀-HA, respectivamente). Estos fragmentos se clonaron por separado en el vector pTREX, se transformaron y seleccionaron epimastigotes de la cepa CL. Estos cultivos se

utilizaron para ensayos de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos anti-HA y anti-CAL 1 (Fig. 35).

En el caso de los cultivos que sobreexpresan TcARM₃₀₀-HA, se detectó una localización puntual particular en el citoplasma de los epimastigotes (Fig. 35 A). Hasta el momento de la presentación de esta Tesis, no se pudo determinar si esta localización coincide con organelas como el aparato de Golgi o la vacuola contráctil, por medio de marcadores de organelas utilizados. Sin embargo, el análisis de perfil de intensidad de fluorescencia que exhibe TcARM₃₀₀-HA coincide con la señal obtenida con el anticuerpo anti-TcCAL1 en una región del espacio citoplasmático del parásito (Fig. 35 B). Esto nos alienta a postular la hipótesis que TcCAL1 se asocia TcARM₃₀₀-HA, generando esa intensidad de señal. Por otro lado, estos mismos ensayos realizados con los cultivos que sobreexpresan TcPFD-HA revelaron que esta proteína de fusión no muestra una ubicación puntual, sino que se localiza a lo largo de todo el cuerpo del parásito (Fig. 35 C). Si bien este patrón es similar al de TcCAL1, queda pendiente un ensayo de co-localización que incluya el anticuerpo anti-CAL1 en estos cultivos.

3.20 Predicción de interacciones de TcARM y TcPFD con TcCAL1

Finalmente, y teniendo en cuenta los resultados de doble híbrido y los ensayos de localización, la posible interacción de las proteínas se estudió mediante un abordaje *in silico*. Los modelos tridimensionales de TcARM y TcPFD se obtuvieron de la base de datos TriTrypDB. La predicción de interacciones se realizó utilizando el servidor de *AlphaFold2* disponible en *Google Colab* en su modo *AlphaFold_multimer_v3*. Este modo, predijo las posibles interacciones entre TcCAL1 con TcARM (proteína entera) o TcPFD a partir de las secuencias de aminoácidos de cada proteína.

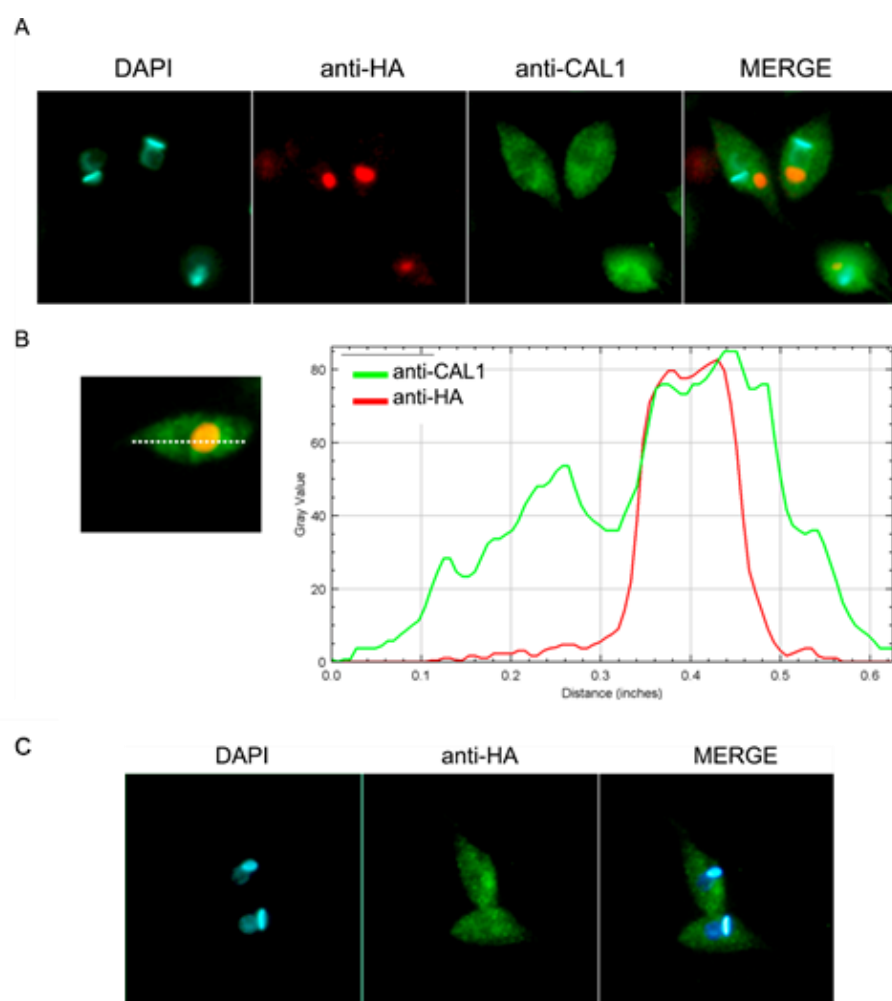


Figura 35. Localización de TcARM₃₀₀ y TcPFD en epimastigotes de *T. cruzi* por microscopia de fluorescencia. **A.** Co-localización de TcARM₃₀₀ con TcCAL1 en epimastigotes que sobreexpresan la proteína TcARM₃₀₀-HA a través del plásmido pTREX. Los parásitos se marcaron con un anticuerpo primario monoclonal anti-HA. La co-localización de TcARM₃₀₀ con TcCAL1 se realizó incubando simultáneamente los parásitos con los anticuerpos anti-HA y anti-CAL1 **B.** Perfil de intensidad en el que se muestra la señal de fluorescencia de anti-HA y anti-CAL1 a lo largo de un epimastigote (línea blanca punteada). **C.** Localización subcelular de PFD en epimastigotes utilizando un anticuerpo anti-HA. Se utilizaron los anticuerpos secundarios de anti-conejo Alexa 488 (verde) o Cy3 (rojo) y anti-ratón Alexa 488 (verde). El colorante DAPI se utilizó para teñir el núcleo y el kinetoplasto.

La proteína TcPFD está formada por dos α -hélices principales que componen, casi en su totalidad, la estructura terciaria de la proteína. El plegamiento que adopta TcPFD, resulta en un acercamiento de sus extremos N y C terminales en donde es más probable que ocurra la interacción con TcCAL1, según la predicción realizada con *AlphaFold2* (Fig. 36). El gráfico de pLDDT (por sus siglas en inglés, *predicted Local Distance Difference Test*), es una medida de la confianza de la predicción de las

estructuras por cada residuo, que puede tomar valores desde 0 a 100, siendo este último el de mayor confianza. En otras palabras, indica principalmente la calidad de la predicción para dominios individuales. En el caso de las interacciones predichas para TcCAL1-TcPFD, la mayor parte de las estructuras se encuentran en valores de pLDDT mayores de 70 para ambas proteínas, lo que indica confianza en la predicción de los dominios. Las regiones con un pLDDT por debajo de 50 pueden ser consideradas regiones desordenadas o poco estructuradas.

Por otro lado, la métrica Error Alineado Predicho (PAE, *Predicted Aligned Error*) indica el error posicional esperado en el residuo X si las estructuras predichas y reales están alineadas en el residuo Y (utilizando los átomos C α , N y C). Los PAE se miden en Ångströms y se limitan a 31.75 Å, es decir, en una escala de puntuaciones donde 0 es excelente y 30 es malo. Estos valores se pueden usar para evaluar la confianza en la posición relativa y orientación de diferentes partes del modelo de la interacción entre dominios. Con este valor se puede estimar si en una estructura multi-dominio los diferentes dominios interactúan y, por lo tanto, asumen una estructura tridimensional (Varadi *et al.*, 2022). En el gráfico PAE de interacción los colores azul y rojo indican mayor y menor probabilidad de interacción por cercanía, respectivamente.

En el caso de TcARM, la estructura muestra una gran cantidad de α -hélices, característico de proteínas con dominios armadillo, que forman una estructura compleja que gira formando una cavidad (Figura 37 A). La predicción de interacciones entre estas dos proteínas señala que TcCAL1 interacciona con mayor probabilidad en la cavidad que forma TcARM, la cual se encuentra más cercana a la región N-terminal (N-ter) (Figura 37 B). La región de 300 aminoácidos C-terminales (c-ter) de TcARM que fueron identificados en el ensayo de doble híbrido se encuentra identificada con color rojo oscuro. El gráfico de pDDLT muestra que la estructura predicha para TcCAL1 tiene un valor de confianza de pLDDT<60 y para TcARM esta métrica se encuentra entre 80 y 100, que indica confianza en la predicción del modelo.

En el caso del gráfico de PAE para TcARM-TcCAL1, las zonas están delimitadas para TcCAL1 en un cuadro de tamaño pequeño indicado como A (cuadro superior) y TcARM como B (cuadro inferior). Las zonas azules (de mejor confianza) son mayoritarias en el gráfico, tanto en la estructura definida para TcCAL1 como para TcARM. Este resultado sugiere confianza en la posición e interacción de los dominios en la estructura predicha.

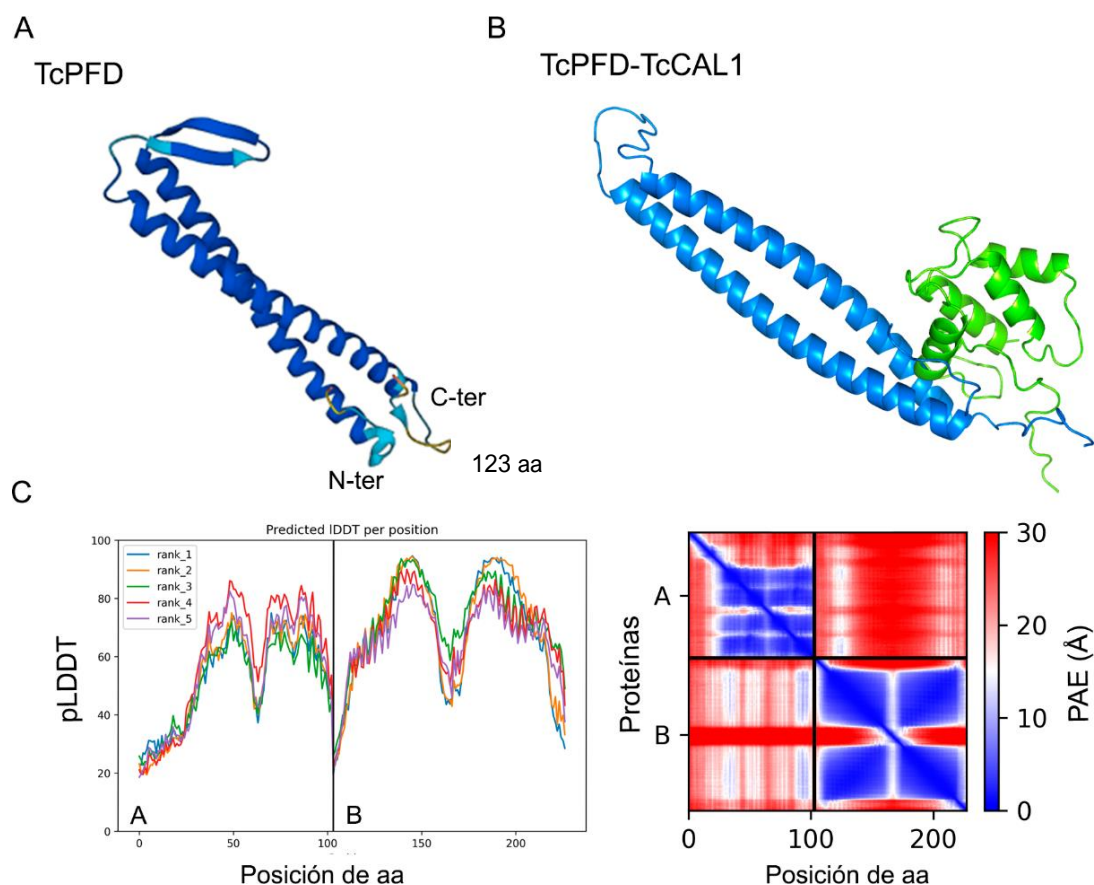


Figura 36. Estructura tridimensional de TcPFD y predicción de interacción con TcCAL1. **A.** Estructura terciaria de TcPFD, modelo disponible en TriTrypDB. **B.** Predicción de interacción de TcPFD con TcCAL1 mediante *AlphaFold2 multimer_v3*. **C.** Gráficos de confianza del modelo pLDDT y PAE de TcPFD-TcCAL1 como complejo (izquierda y derecha, respectivamente). En el gráfico PAE, el eje X representa cada aminoácido de la secuencia de la proteína (de N a C-ter). La zona superior izquierda A e inferior derecha B del gráfico PAE corresponden a TcCAL1 y TcPFD, respectivamente. Los valores de PAE altos y bajos (zonas rojas y azules) indican baja y alta confianza en la posición y orientación relativa de los dos dominios del complejo formado, respectivamente. pLDDT<50, baja calidad; 50<pLDDT<70 calidad moderada; 70<pLDDT<90 alta calidad; 90<pLDDT<100 calidad excelente. Proteína A: TcCAL1 y B: TcPFD. Å, Armstrong.

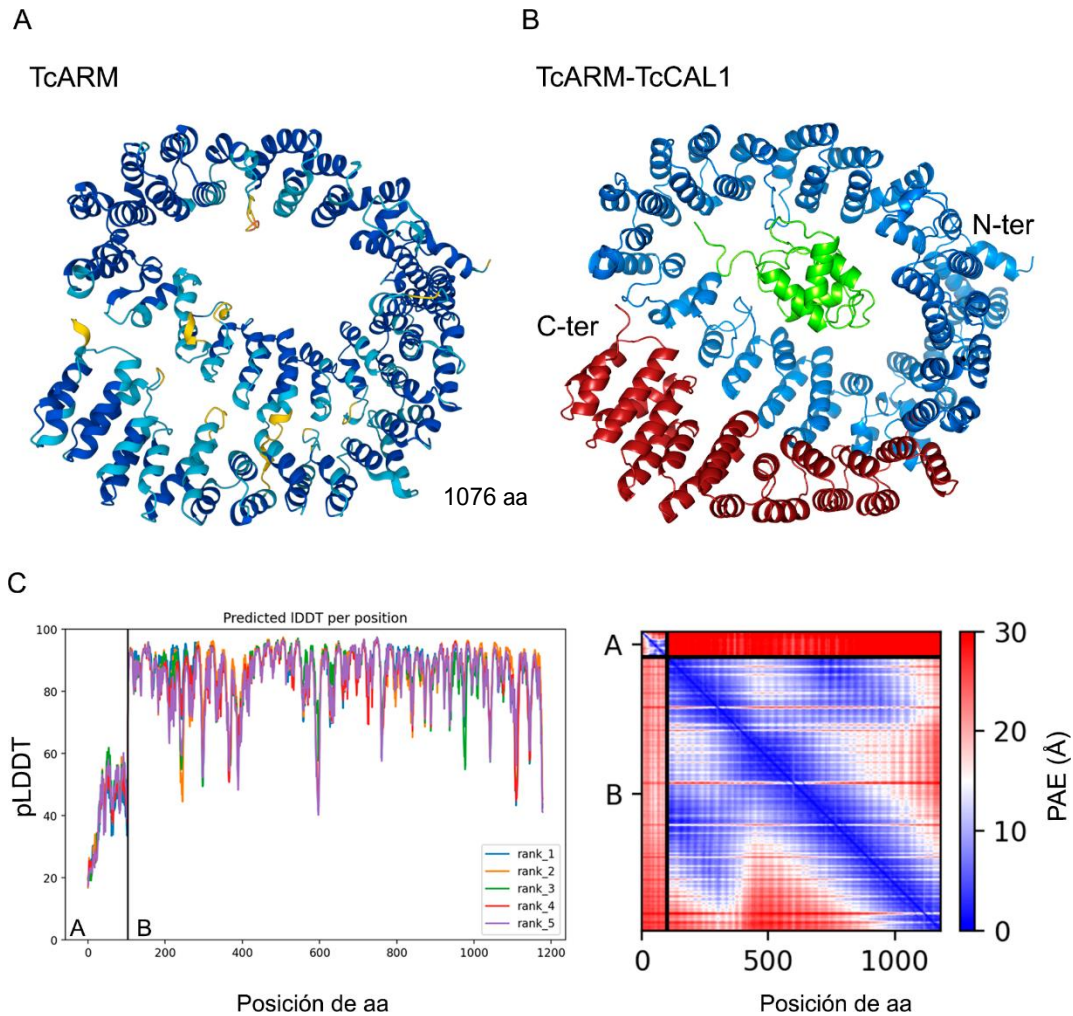


Figura 37. Estructura tridimensional de TcARM y predicción de interacción con TcCAL1. **A.** Estructura terciaria de TcARM, modelo disponible en TriTrypDB. **B.** Predicción de interacción de TcARM con TcCAL1 mediante *AlphaFold2 multimer_v3*. **C.** Gráficos de confianza de modelo pLDDT y PAE de TcARM-TcCAL1 como complejo (izquierda y derecha, respectivamente). La zona superior izquierda A e inferior derecha B del gráfico PAE corresponden a TcCAL1 y TcARM, respectivamente. Los valores de PAE altos y bajos (zonas rojas y azules) indican baja y alta confianza en la posición y orientación relativa de los dos dominios del complejo formado, respectivamente. pLDDT<50, baja calidad; 50<pLDDT<70 calidad moderada; 70<pLDDT<90 alta calidad; 90<pLDDT<100 calidad excelente. Proteína A=TcCAL1 y B=TcARM. Å, Armstrong.

4. Discusión

La anotación del primer proyecto genoma de *T. cruzi* reveló que cerca de 56% del total de los marcos abiertos de lectura codifican para proteínas hipotéticas (Silber and Pereira, 2012). No obstante, la complejidad de genoma del parásito, debido a su alto contenido de secuencias repetidas y genes organizados en tándem, representó un desafío para la calidad del ensamblado y la precisión de su anotación. Los avances en las tecnologías de secuenciación de tercera generación permitieron obtener lecturas más extensas del genoma, mejorando así su ensamblado. Estas nuevas aproximaciones revelaron que el porcentaje de proteínas hipotéticas en *T. cruzi*, específicamente en la cepa Dm28c, se redujo a un 39% (Berná *et al.*, 2018). A pesar de esta disminución, dicho porcentaje representa al menos 6 mil marcos abiertos de lectura que codifican para proteínas que aún no han sido caracterizadas, lo que implica una cantidad considerable de información sobre la biología del parásito que permanece desconocida.

Con el objetivo de estudiar nuevas proteínas potencialmente involucradas en la señalización de Ca^{2+} y profundizar en el conocimiento de la biología de *T. cruzi*, este trabajo se enfocó en la caracterización de TcCAL1, una proteína sin función putativa asignada, anotada como “hipotética” en el genoma del parásito. La elección de TcCAL1 como proteína de estudio resultó de una búsqueda en las bases de datos, que nos permitieran identificar nuevas proteínas conteniendo motivos de unión a Ca^{2+} y evidencia experimental de expresión.

La secuencia de aminoácidos de TcCAL1 se utilizó para construir un árbol filogenético que muestra que es una proteína conservada en los tripanosomátidos. Todas las cepas de *T. cruzi* evaluadas forman un clado que se diferencia de los tripanosomas africanos y de los tripanosomas de interés veterinario. A su vez, todos los organismos del género tripanosoma se encuentran separados por un posible evento de duplicación en el organismo *Blechnomonas ayalai*. Esta separación, dio origen a otro clado que comparten todos los parásitos del género *Leishmania sp* y otros tripanosomátidos como los organismos del género *Leptomonas sp.* y *Crithidia sp.*

A nivel proteína, se han identificado péptidos que corresponden a TcCAL1 en distintos estudios de proteomas de varias cepas de *T. cruzi*: Atwood (2005), Marchini *et al.*, (2011), Queiroz *et al.*, (2014) y Santos Júnior *et al.*, (2021), en las cepas Brasil (TcI), Berenice (TcII), Dm28c (TcI) y CL Brener (TcVI), respectivamente. En esta investigación, se confirmó la expresión de la proteína en las cepas Y (TcII), CL (TcI) y Dm28c mediante *western blot*, y espectrometría de masa (ver Anexo). En conjunto, estos estudios

cualitativos demuestran la expresión de TcCAL1 en diferentes cepas y unidades discretas de tipificación (DTUs) de *T. cruzi*.

En relación con los niveles de expresión de TcCAL1 en distintos estadios, en este estudio mostramos que esta proteína se expresa en mayores niveles en las formas tripomastigotes derivadas de células en comparación con las formas epimastigotes o amastigotes axénicos, de la cepa Dm28c. Estos resultados concuerdan con el trabajo de proteómica cuantitativa de Godoy *et al.*, (2012), que reveló que la abundancia relativa de TcCAL1 en las formas epimastigotes de la cepa Dm28c es menor que en las formas tripomastigotes metacíclicas y sugieren que las formas infectivas expresan niveles más elevados de TcCAL1 en comparación con las no infectivas, en las cepas estudiadas.

Es importante señalar que, aunque la regulación de la expresión génica en los tripanosomátidos es predominantemente de carácter post-transcripcional (Araújo and Teixeira, 2011; Chávez et al., 2021b), nuestros hallazgos de mayor expresión de proteína en las formas infectivas del parásito se correlacionan con los niveles de transcritos encontrados mediante microarreglos realizado por Minning *et al.*, (2009). Estos autores evaluaron las abundancias relativas de los RNA mensajeros (mRNA) en diferentes estadios de la cepa Brasil de *T. cruzi*. Las formas amastigotes mostraron mayores niveles de transcritos de TcCAL1, seguido de las formas tripomastigotes derivados de células, luego tripomastigotes metacíclicos y por último epimastigotes. Por otro lado, Smircich *et al.*, (2015), empleó técnicas de transcriptómica mediante RNA-seq y perfilado de ribosomas (conocido como *ribosome profiling* o Ribo-seq), para analizar el transcriptoma y el translatoma de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de la cepa Dm28c. En este trabajo, los autores mostraron que los niveles de ARN mensajero de TcCAL1 eran superiores en tripomastigotes metacíclicos comparado con epimastigotes. Sin embargo, el análisis de Ribo-seq reveló niveles opuestos (mayores tasas de traducción en epimastigotes que en tripomastigotes derivados de células). Finalmente, Díaz-Viraqué *et al.*, (2023) utilizando la técnica de captura de conformación cromosómica (Hi-C por *chromosome conformation capture*), evaluó cuantitativamente la expresión génica en la cepa Dm28c. Los resultados revelaron que los transcritos de TcCAL1 fueron más abundantes en los tripomastigotes derivados de células que en epimastigotes y amastigotes.

La evidencia experimental de otros trabajos en conjunto con los resultados de esta Tesis, sugieren que los niveles de transcritos y/o proteína de TcCAL1 son más elevados o más estables en las formas no replicativas infectivas para el hospedador mamífero,

como los tripomastigotes metacíclicos y derivados de células, en comparación con el estadio replicativo que se desarrolla en el insecto vector.

En este trabajo, los estudios funcionales de TcCAL1 en *T. cruzi* se estudiaron mediante el análisis del fenotipo en algunos procesos del ciclo de vida de cultivos que sobreexpresan TcCAL1x6His o *hemi-knockout* para el gen *tccal1*.

Lammel (1996), estudió como afectan los niveles de Ca^{2+} en la multiplicación de *T. cruzi* y determinó que la disponibilidad intracelular de este ion es importante para la proliferación de epimastigotes. En este trabajo, se encontró que tanto la sobreexpresión de TcCAL1x6His como la interrupción de una de las copias del gen *tccal1*, no afectan significativamente el crecimiento de epimastigotes de las cepas estudiadas. Este comportamiento, puede estar relacionado a que la TcCAL1 endógena es una proteína relativamente abundante, por lo cual quizá su sobreexpresión no resulta tóxica para la célula y le permite al parásito modular eficazmente los niveles de Ca^{2+} intracelular. Esta hipótesis se sustenta el hecho de que TcCAL1 se detecta fácilmente en los proteomas (Atwood 2005, Marchini et al., 2011, Queiroz et al., 2014, Santos Júnior et al., 2021).

Sin embargo, se observó que tanto los cultivos *hemi-knockout* como los que sobreexpresan TcCAL1 recombinante (este último, sólo la cepa CL), llegan más rápidamente a la fase estacionaria. Dicho de otro modo, estos cultivos alcanzan una densidad de cultivo menor en condiciones de crecimiento *in vitro*. Los efectos fenotípicos observados podrían atribuirse a una serie de mecanismos que pueden actuar de manera sinérgica o independiente. Por un lado, puede estar relacionado con el cambio metabólico que experimentan las formas epimastigotes en fase estacionaria de crecimiento, cuando la glucosa es limitada (Barisón *et al.*, 2017). Los parásitos experimentan una mayor sensibilidad a los mecanismos dependientes de Ca^{2+} para el mantenimiento de la bioenergética mitocondrial (Chiurillo *et al.*, 2019, 2017), lo que podría afectar las tasas de proliferación provocando una entrada temprana a la fase estacionaria de los cultivos, debido a la baja disponibilidad de Ca^{2+} citosólico como consecuencia del secuestro del ion por la sobreexpresión de TcCAL1x6His. Este efecto negativo en la fase estacionaria de la proliferación no se observó en la cepa Y, en donde tanto los niveles de proteína recombinante sobreexpresada y densidad del cultivo fueron menores que para la cepa CL. Esto podría influir en la ausencia de fenotipo, dado por no agotarse los nutrientes, ausencia de niveles tóxicos de expresión y/o menor capacidad de secuestro de Ca^{2+} en la cepa Y. Por otro lado, la proliferación de los

epimastigotes *hemi-knockout* para *tccal1*, también mostraron una entrada temprana a la fase estacionaria en comparación con sus controles, los parásitos *scrambled*. Este efecto fenotípico podría estar relacionado a alguna actividad de TcCAL1 que no depende de Ca^{2+} , aunque no se puede descartar un posible efecto tóxico de la enzima Cas9 por expresión diferencial entre los parásitos *hemi-knockout* y sus controles. En relación a lo anterior, la secuencia de TcCAL1 comparte un 76% de identidad con su ortólogo en *T. brucei* (Tb927.11.9860), uno de los organismos más estudiados entre los tripanosomátidos. Los datos experimentales disponibles para este parásito constituyen un punto de partida útil de correlación con *T. cruzi*. En *T. brucei*, los estudios del silenciamiento del ortólogo de *tccal1* por *RNAi* tiene un efecto detrimental para la proliferación de las formas procíclicas y para la diferenciación hacia las formas sanguíneas (Alsford *et al.*, 2011).

Los niveles de Ca^{2+} experimentan cambios significativos durante la progresión del ciclo de vida de *T. cruzi* y desempeñan un papel muy importante en los procesos de diferenciación (Hashimoto *et al.*, 2016). Específicamente, se ha demostrado que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es necesario para desencadenar la metaciclologénesis (Lammel *et al.*, 1996), y varios canales permeables o activados por este ion se han involucrado en este proceso (Dave *et al.*, 2021; Lander *et al.*, 2018). Se han identificado y caracterizado varias proteínas mitocondriales involucradas en la homeostasis intracelular del Ca^{2+} que también cumplen un rol en la metaciclologénesis de *T. cruzi* (Bertolini *et al.*, 2019; Chiurillo *et al.*, 2020b, 2019; Dos Santos *et al.*, 2021; Hamedi *et al.*, 2015; Hashimoto *et al.*, 2016).

En este trabajo, se encontró que la sobreexpresión de TcCAL1x6His inhibe significativamente la metaciclologénesis en las cepas CL e Y en un 50% y 39%, respectivamente. El mismo resultado se encontró en la cepa Y empleando el medio TAU. Cabe aclarar que el medio TAU, no resultó útil para diferenciar la cepa CL, posiblemente debido a la pérdida de la capacidad de respuesta a estímulos externos debido al tiempo prolongado de mantenimiento en cultivo como forma epimastigote (De Los Milagros Cámara *et al.*, 2013; Sullivan, 1982). La reducción en la capacidad de diferenciación de estos parásitos podría explicarse por un efecto inhibitorio de este proceso mediante la actividad quelante de Ca^{2+} de TcCAL1x6His, limitando la disponibilidad de este ion en el citosol. Se podría especular que, menores niveles de Ca^{2+} podrían afectar la actividad de proteínas moduladas por este segundo mensajero, incluyendo aquellas que desempeñan roles específicos durante la metaciclologénesis. Esta observación se

relaciona con la mayor sobreexpresión de TcCAL1x6His en la cepa CL y su impacto en la inhibición de la metacicloogénesis, en contraste con la cepa Y, que presenta niveles más bajos de la proteína y una tasa de diferenciación mejorada en comparación con la cepa CL.

En este punto, hay que destacar que durante la realización de este trabajo se optimizó la técnica de diferenciación en medio bifásico agar sangre/LIT, con el cual se obtuvo un mejor rendimiento en la diferenciación de epimastigotes y una mejor respuesta de los parásitos al estímulo que con el medio TAU. Este resultado nos lleva a proponer que este medio de cultivo promueve la metacicloogénesis por la posible estimulación de la enzima adenilato ciclasa (AC), encargada de la síntesis de AMPc en *T. cruzi*. Distintos autores proponen la relación de la activación de la AC y la disponibilidad de AMPc como factores clave en la transición a la forma metacíclica del parásito (Hamedi *et al.*, 2015; Lander *et al.*, 2021; Rangel-Aldao *et al.*, 1988). Asimismo, varios estudios sugieren que la α -D-globina, constituyente de la hemoglobina sanguínea (componente del medio BAL), estimula la enzima AC y promueve la metacicloogénesis *in vitro* (Fraidenraich *et al.*, 1993b, 1993a; Garcia *et al.*, 1995; Gonzales-Perdomo *et al.*, 1988). Además, se ha planteado que una AC flagelar activada por Ca^{2+} pueda estar relacionada con la metacicloogénesis (D'Angelo *et al.*, 2002). Esto abre la posibilidad de investigar si otras proteínas de unión a Ca^{2+} también participan en la estimulación de la producción del AMPc desencadenando la metacicloogénesis.

Respecto los parásitos editados genéticamente mediante CRISPR/CAS9, aunque se lograron obtener cepas *hemi-knockout*, con una disminución de los niveles de TcCAL1 endógena, no se lograron diferenciar epimastigotes a formas metacíclicas del parásito, con ninguna de las técnicas empleadas. Esto nos impidió avanzar con otros ensayos funcionales y de análisis de fenotipo en otras formas de desarrollo utilizando estas líneas editadas genéticamente.

El hallazgo de la inhibición de la metacicloogénesis en cultivos que sobreexpresan TcCAL1x6His dirigió la atención a explorar los efectos que la proteína recombinante podría desencadenar en los procesos de invasión del parásito a la célula hospedadora.

Para evaluar los efectos de la sobreexpresión de TcCAL1 en la invasión, fue necesario optimizar a 300:1 la relación parásito: célula hospedadora para los tripomastigotes metacíclicos de la cepa Y. En nuestro caso, si bien la cepa Y se pudo diferenciar a tripomastigotes metacíclicos que infectaron células y se transformaron en

amastigotes intracelulares, nunca pudimos obtener tripomastigotes derivados de células debido a que en el sobrenadante de cultivo de células infectadas siempre se obtuvieron formas amastigotes-*like*. Por otro lado, en las infecciones *in vivo* en modelo murino con tripomastigotes metacíclicos, tampoco fue posible obtener tripomastigotes sanguíneos, ya sea para realizar ensayos funcionales *in vitro* o para recuperar la virulencia de estos tripomastigotes. Esto limitó los ensayos posteriores *in vivo* que teníamos planificados para los parásitos sobreexpresantes de TcCAL1. El elevado número de parásitos con respecto a las células de mamífero en los experimentos de invasión nos resultó llamativo, pero lo atribuimos a la disminución de la virulencia, fenómeno que puede ocurrir si los parásitos son mantenidos en cultivos axénicos por largos periodos, sin pasaje de rutina por el animales de laboratorio (Contreras *et al.*, 1985; Libisch *et al.*, 2021). En estas condiciones, se encontró que la sobreexpresión de TcCAL1x6His promovió tanto los procesos de adhesión como de invasión de los tripomastigotes metacíclicos a células de mamífero. Esto resultó contrario a lo que esperábamos, ya que un supuesto secuestro de Ca^{2+} por TcCAL1x6His provocaría un efecto negativo en los aspectos de infección estudiados.

Los primeros pasos de la interacción de *T. cruzi* con la célula hospedadora implican la adhesión, activación de vías de señalización bidireccionales en la células hospedadora y en el parásito y finalmente la invasión (De Souza *et al.*, 2010). La adhesión implica el reconocimiento de moléculas específicas presentes tanto en la superficie del parásito como de la célula y desencadenan vías de señalización, entre ellas vías de señalización mediadas por Ca^{2+} , que resultan en la internalización eficiente del parásito (Ferri & Edreira, 2021; Maeda *et al.*, 2012). La mayoría de los estudios que aborda la participación de Ca^{2+} en la invasión de *T. cruzi* lo hace desde el punto de vista de la célula hospedadora, en donde están bastante definidas las moléculas que participan en todo el proceso. Sin embargo, en esta discusión nos concierne la participación del Ca^{2+} desde el punto de vista del parásito.

Nuestra hipótesis sobre el efecto negativo en la invasión de *T. cruzi* debido al secuestro de Ca^{2+} , se basó en otros trabajos que han demostrado que la interacción de *T. cruzi* con la célula hospedadora implica un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del parásito cuando se adhiere a la célula (Docampo & Moreno, 1996; Moreno *et al.*, 1994; Ruiz *et al.*, 1998b), así como también que el pre-tratamiento de los parásitos con quelantes de Ca^{2+} inhiben su internalización a las células hospedadoras (Moreno *et al.*, 1994; Yakubu *et al.*, 1994). Esto lo confirmó Manchola-Varón *et al.*, (2021) en un estudio en el que tripomastigotes

derivados de células fueron expuestos a proteínas de la membrana de células de mamífero. Los autores observaron que el incremento de los niveles de Ca^{2+} en el parásito se debieron a la entrada del ion desde el medio extracelular por el efecto de la nifedipina, un bloqueador de canales de Ca^{2+} tipo L, que inhibió tanto el incremento de los niveles de Ca^{2+} como la invasión. Estos trabajos muestran que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son necesarios para la adhesión y el proceso de invasión del parásito a la célula hospedadora. Por lo tanto, esto sugiere que el aumento de la virulencia de los tripomastigotes metacíclicos debido a la sobreexpresión de TcCAL1x6His es promovido por alguna actividad ejercida por TcCAL1 en lugar de ser causado por el secuestro de Ca^{2+} , o también podría resultar de la actividad de otra proteína activada por TcCAL1 involucrada en los procesos de invasión.

En nuestros experimentos, también encontramos que los cultivos infectados con parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His podría beneficiar la replicación de amastigotes intracelulares. Este resultado, se intentó correlacionar con experimentos de diferenciación *in vitro*, de las formas de las formas tripomastigotes metacíclicas a amastigotes axénicas, donde si bien hubo una tendencia de aumento en la tasa de amastigogénesis en los parásitos que sobreexpresan TcCAL1x6His, no hubo diferencias significativas. Esta discordancia entre los dos resultados, claramente puede deberse a las diferencias propias de cada abordaje.

La señalización mediada por Ca^{2+} en los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* no ha sido exhaustivamente investigada. Sin embargo, analizando los estudios relacionados al rol del Ca^{2+} en la replicación del estadio intracelular se encontró que, parásitos que sobreexpresan el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (TcIP3R), el cual media la liberación de Ca^{2+} al citoplasma desde los acidocalcisomas, provoca la disminución de proliferación de amastigotes intracelulares como amastigotes diferenciados *in vitro* en medio ácido (Chiurillo et al., 2020a; Hashimoto et al., 2013). Esto indica que el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de esta vía tiene efectos negativos en la multiplicación de amastigotes. Asimismo, la activación del receptor TcIP3R, mediante la producción de IP3 por la enzima fosfoinosítido fosfolipasa C (PI-PLC), desencadena la liberación de compartimientos internos de Ca^{2+} en el parásito. En un estudio realizado por Okura et al., (2005), los parásitos con inhibición de PI-PLC mostraron una diferenciación de tripomastigotes metacíclicos a las formas amastigotes axénicas (amastigogénesis *in vitro*) menos eficiente y la sobreexpresión provocó mejores tasas de amastigogénesis. En este caso el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en los parásitos promueve la amastigogénesis *in vitro*. Este último,

muestra un comportamiento distinto que puede deberse al efecto sinérgico que podría ejercer el diacilglicerol (DAG), otro producto en la enzima PI-PLC. En este sentido, los datos consultados en la bibliografía no parecen mostrar concordancia en cuanto a este proceso de diferenciación del parásito. De igual manera, nuestros experimentos de amastigogénesis *in vitro*, los efectos producidos por TcCAL1 no muestran significancia estadística que nos permita establecer un resultado concluyente.

En consecuencia, es posible entonces que los resultados encontrados en los cultivos que expresan la versión recombinante de TcCAL1 reflejen algunas cuestiones interesantes: que TcCAL1 sea capaz de interactuar con otras proteínas vinculadas directamente o indirectamente con los procesos de adhesión, internalización o invasión; que actúe como un factor de virulencia *per se*; que sea secretada al medio extracelular.

Con respecto a esto último, en *T. cruzi* se ha estudiado ampliamente la secreción de vesículas extracelulares (VEs) en relación a diversos procesos, como la comunicación célula-célula, la evasión de la respuesta inmune y la infección (Cronemberger-andrade *et al.*, 2020; De Pablos & Osuna, 2012; Nogueira *et al.*, 2015). En este sentido, la revisión de dos trabajos que involucran el estudio proteómico de VEs de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos (Bayer-Santos *et al.*, 2013) y de secretoma de tripomastigotes derivados de células (Brossas *et al.*, 2017) no detectaron péptidos de TcCAL1. Sin embargo, en otro análisis proteómico de tripomastigotes derivados de células, se identificaron péptidos de TcCAL1 tanto en VEs como en fracciones de proteínas solubles secretadas (Ribeiro *et al.*, 2018). En dicho estudio, varios péptidos de TcCAL1 aparecieron en una de dos réplicas biológicas en la fracción secretada soluble y en dos de cinco réplicas biológicas de VEs de la cepa Y. Los autores también detectaron proteínas del citoesqueleto y proteínas citosólicas que podrían significar la contaminación de las fracciones. Estudios más detallados que indaguen sobre la presencia activa de TcCAL1 como proteína secretada resultarían importantes para comprender los efectos de esta proteína en la invasión al mismo tiempo, confirmarían un posible rol en la virulencia del parásito.

En relación a lo anterior, este trabajo de Tesis mostró una distribución de TcCAL1 a lo largo de todo el cuerpo del parásito por inmunofluorescencia. Es interesante que estudios de proteómica de proteínas asociadas a la cromatina de *T. cruzi*, (Leandro De Jesus *et al.*, 2017) identificaron péptidos de TcCAL1 tanto en epimastigotes como en tripomastigotes, siendo parte de las proteínas mayor representatividad en dichas

muestras. Sin embargo, en nuestro análisis por microscopia, TcCAL1 no evidenció una localización nuclear en ninguno de los estadios estudiados. Los datos experimentales disponibles en el ortólogo en *T. brucei* (Tb927.11.9860) sobre el etiquetado endógeno de la proteína y la localización mediante inmunofluorescencia, mostraron que se encuentra en el citoplasma, el flagelo y el lumen nuclear (Billington *et al.*, 2023).

Por otro lado, al analizar la presencia de TcCAL1 en distintas fracciones de extractos celulares de *T. cruzi*, se encontró que, si bien la proteína se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble, también se detecta en la fracción microsomal insoluble. Mas allá de que estas fracciones son un enriquecimiento en proteínas solubles o asociadas a membranas, más que una purificación, quisimos evaluar si la palmitoilación de TcCAL1 se relacionaba con la asociación de la proteína a membranas. El ensayo por la técnica ABE confirmó que TcCAL1 puede modificarse por palmitoilación, en línea con el buen índice de confianza de la predicción de palmitoilación *in silico* de TcCAL1 las cisteínas 94 y 95. Estos resultados son concordantes con la detección de TcCAL1 en fracciones microsomales del lisado de epimastigotes. Sin embargo, los estudios de localización por inmunofluorescencia para determinar si la proteína se asocia a membrana durante su ciclo de vida debe ser revisado.

La palmitoilación de proteínas consiste en la adición covalente y reversible de cadenas de ácidos grasos de 16 carbonos (16-C) a residuos de cisteína a través de un enlace tioéster (Linder & Jennings, 2013). En las células eucariotas, la unión covalente de ácido palmítico a residuos de cisteína es una modificación post-traducciona reversible que juega un papel muy importante en la función proteica (Aicart-Ramos *et al.*, 2011), tales como anclaje a membranas, el tráfico de proteínas a compartimientos intracelulares, la estabilización para prevenir la ubiquitinación y posterior degradación, y la interacción proteína-proteína (Linder & Deschenes, 2007; Shenoy-Scaria *et al.*, 1993).

Una característica de la palmitoilación es que ancla proteínas a membranas en microdominios con alto contenido de esteroides y enriquecidos en proteínas de señalización, también llamados *lipid rafts* (Edidin, 2003; Simons & Ikonen, 1997). Esta modificación postraducciona es llevada a cabo por dos familias de proteínas: las palmitoil transferasas con dominios DHHC (por el motivo consenso, DHHC) (DHHC-PATs) y las O-aciltransferasas unidas a membrana (Corvi, 2011; Roth *et al.*, 2002). En *T. cruzi*, se demostró que la maquinaria de palmitoilación a través de DHHC-PATs se expresa en epimastigotes (Batista *et al.*, 2018). Otros estudios encontraron que la modificación por palmitoilación y miristoilación (por unión de miristato a un residuo de glicina) de la

proteína de unión a Ca^{2+} del flagelo (FCaBP) es necesaria para su ubicación flagelar (Godsel, 1999; Wingard *et al.*, 2008). De igual manera, se determinó que la unión de Ca^{2+} a los dominios *EF-hand* de FCaBP parecen regular su asociación a la membrana del flagelo (Godsel, 1999; Maric *et al.*, 2015). Otra característica importante de la palmitoilación, es la relación que tiene con proteínas de protozoos del *Phylum Apicomplexa* que están involucradas en la virulencia de los parásitos (Brown *et al.*, 2017; Corvi, 2011). En tripanosomátidos, estas relaciones entre factores de virulencia y palmitoilación están en vías de estudio (Revisado por: Brown *et al.*, 2017; Goldston *et al.*, 2014). En particular, en *T. brucei* se conoce que la calflagina, una proteína con dominios de unión a Ca^{2+} que se localiza en la membrana del flagelo del parásito, experimenta palmitoilación. La inhibición de la modificación postraducciona determina su localización flagelar y reduce la parasitemia en modelos de infección en ratón (Emmer *et al.*, 2010). Nuestros resultados abren nuevas preguntas sobre la posible relación entre palmitoilación de TcCAL1 con una posible función como factor de virulencia.

Paralelamente a los estudios fenotípicos del parásito cuando los niveles de TcCAL1 se alejan de los fisiológicos, nos propusimos como objetivo caracterizar el entorno molecular de TcCAL1 por ensayos de doble híbrido en levaduras. Para esto, se enfrentó a la proteína TcCAL1 en un contexto intracelular, con una biblioteca de cDNA de epimastigotes de *T. cruzi* que fue previamente utilizada para detectar interacciones de otras proteínas en el parásito, como los motivos MORN-TcPIN o Ciclina-CDKs (Erben *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2001). Con análisis de las interacciones en este trabajo se identificaron dos proteínas que posiblemente se asocien a TcCAL1. Una de ellas corresponde a la fracción C-terminal de una proteína con dominios armadillo (ARM) y la otra presenta dominios del tipo prefoldina (PFD). Ambas proteínas están anotadas como proteínas hipotéticas y, hasta la fecha, no han sido caracterizadas.

Las proteínas con dominios ARM están formadas por repeticiones en tándem de 42 aminoácidos de longitud que se asocian para formar estructuras de α -hélice superpuestas y conforman una plataforma ideal de unión con sus interactores (Huang *et al.*, 2021; Peifer *et al.*, 1994). Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas entre los organismos eucariotas y cumplen una variedad de funciones, como: adhesión celular, transducción de señales, regulación de la función mitocondrial, transporte de proteínas del núcleo al citoplasma y otros procesos (Coates, 2003; Huang *et al.*, 2021). Aunque han sido ampliamente estudiadas en eucariotas multicelulares, hay poca información disponible en eucariotas unicelulares, incluyendo los tripanosomátidos

(Mitra *et al.*, 2016). Sin embargo, TgARO una proteína con dominios ARM ha sido identificada y vinculada con procesos de invasión, jugando un papel crucial en la translocación y la fijación de las roptrías al polo apical de *Toxoplasma gondii* (Ben Chaabene *et al.*, 2021; Mueller *et al.*, 2016). También, en otro de los miembros de *Phylum Apycomplexa*, *Plasmodium falciparum*, la proteína con dominios ARM PfARO presenta una ubicación en el núcleo y citoplasma. PfARO tiene características similares a las moléculas tipo β -catenina, las cuales están implicadas en vías de señalización que van desde la alteración de la expresión génica hasta la modificación de la polaridad citoesquelética (Mitra *et al.*, 2016). Asimismo, se demostró que PfARO ejerce un rol importante en la posición de las roptrías y la consecuente invasión de los eritrocitos de *P. falciparum* (Ben Chaabene *et al.*, 2021; Cabrera *et al.*, 2012). Esto vincula a estas proteínas con los procesos de invasión en estos parásitos. Sin embargo, esta proteína tiene una longitud de 275 aa y comparte sólo un 27% de identidad con la TcARM. La relación de las funciones de las proteínas ARM con la señalización mediada por Ca^{2+} no ha sido reportada.

Por otro lado, las prefoldinas (PFD) son complejos proteicos heterohexaméricos que actúan como chaperonas, encargadas de asistir junto con otras chaperonas en el plegamiento correcto de proteínas recién sintetizadas por los ribosomas (Tahmaz *et al.*, 2022). También, se les ha descrito en roles importantes en el desarrollo y progresión de enfermedades degenerativas (Liang *et al.*, 2020). En tripanosomátidos, se han encontrado prefoldinas en varios estudios proteómicos validando su expresión en estos parásitos; sin embargo, su función más allá de ser complejos de chaperonas no ha sido objeto de estudio (Fleming *et al.*, 2013; Mandacaru *et al.*, 2019; Queiroz *et al.*, 2014). Por el contrario, en *P. falciparum* se demostró que una prefoldina (Pf-PFD6) se expresa durante los estadios asexuales sanguíneos del parásito e interactúa con la proteína de superficie del merozoito (MSP-1), la cual es una proteína clave en la invasión de eritrocitos por parte del parásito causante de la malaria (Kumar *et al.*, 2022).

En este contexto, se llevó a cabo la localización celular de TcARM (fracción C-terminal de 300 aa) y TcPFD en epimastigotes que sobreexpresan ambas proteínas fusionadas con una etiqueta HA, mediante inmunofluorescencia. El marcaje reveló que TcPFD se distribuye a lo largo de todo el cuerpo de los epimastigotes. Por otro lado, TcARM mostró una localización puntual, sugiriendo la posibilidad de que se encuentre en una organela específica. La localización puntual plantea preguntas sobre si coincide con la ubicación de la proteína completa o si podría deberse a un artefacto de la

sobreexpresión. El marco de este trabajo no se abordó un marcaje estricto de diferentes organelas para determinar específicamente cual compartimiento podría estar ocupando TcARM; sin embargo, si se realizó la co-localización con TcCAL1. El análisis de la intensidad de señal de fluorescencia tanto de TcCAL1 con TcARM reveló que, a pesar de que TcCAL1 localiza a lo largo del cuerpo del parásito, tiene un pico de intensidad de fluorescencia que coincide la señal detectada de TcARM en su ubicación puntual. Con esto, no es posible afirmar que las proteínas están asociadas físicamente, pero si sugerir que ambas proteínas comparten la misma localización en epimastigotes de *T. cruzi*.

Otro aspecto que llamó la atención fue que TcCAL1 reconstituyó la transcripción del gen *his3* en el ensayo de autoactivación del doble híbrido. Esto llevó a la búsqueda y estudio de bibliografía enfocado en la implicación de las proteínas con motivos *EF-hand* como factores de transcripción. Se encontró que algunas proteínas con motivos *EF-hand* tienen la capacidad de interactuar directamente con dominios regulatorios del DNA y actuar como factores de transcripción. Un ejemplo de estas proteínas son DREAM y URE3-BP, las cuales ejercen esa función de una manera dependiente de Ca^{2+} (Carrión *et al.*, 1999; Gilchrist *et al.*, 2001). Este antecedente, en conjunto con la detección de péptidos de TcCAL1 asociados a cromatina (Leandro De Jesus *et al.*, 2017), y con nuestros hallazgos fortuitos de doble híbrido, resulta en un aspecto interesante de la posible función de esta proteína que puede ser abordado en futuras investigaciones.

Otra de las técnicas que comúnmente se usan para validar interacciones entre complejos de proteínas es la co-inmunoprecipitación (Co-IP) (Ning *et al.*, 2014). En este trabajo se realizó un estudio preliminar utilizando extractos proteicos de epimastigotes y el anticuerpo anti-TcCAL1 para identificar, a través de un otro método, las proteínas asociadas a TcCAL1 mediante Co-IP acoplada a espectrometría de masas (MS) (Ver Anexo, Tabla 10). En este caso se utilizó DSS (ditiobis succinimidil propionato), un *crosslinker* que estabiliza las interacciones proteína-proteína (Akaki *et al.*, 2022). En este ensayo, además que se detectó TcCAL1 lo cual es un indicio de buena calidad del experimento, se detectaron proteínas que están fuertemente involucradas con los procesos de invasión a la célula hospedadora, tales como la familia de proteínas de gen disperso 1 (*Dispersed gene family protein 1* - DGF-1), transialidasa y la proteína pequeña de unión a GTP Rab1 (*Small GTP-binding protein Rab1*) (Ver tabla 10 en anexo) (De Pablos & Osuna, 2012; Ferri *et al.*, 2023; Ramírez, 2023). También, se identificó otra proteína con dominios PFD que no corresponde con la detectada por doble híbrido. No

obstante, es necesario enfrentar los resultados con una muestra control debido a que por dificultades técnicas no se pudieron obtener estos datos para validar el estudio.

Dentro del contexto del análisis de las proteínas asociadas, se utilizó la herramienta en línea *AlphaFold2 Colab* para investigar las interacciones de las proteínas asociadas con TcCAL1 (Mirdita *et al.*, 2022). *AlphaFold* es un sistema de inteligencia artificial que utiliza técnicas de aprendizaje profundo y redes neuronales para predecir la estructura tridimensional de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos (Jumper *et al.*, 2021). *AlphaFold2*, una versión mejorada de *AlphaFold*, fue lanzado inicialmente sin la capacidad de modelar complejos de proteínas. Sin embargo, la segunda versión incluye este tipo de análisis (Bryant *et al.*, 2022; Evans *et al.*, 2021). El modelado de las interacciones de TcCAL1 con TcPFD, mostró que TcPFD adopta un plegamiento en el que sus extremos N y C-terminales se encuentran formando la zona distal en donde TcCAL1 interactúa. En eucariotas, esta zona de las PFD es llamada zona de “tentáculos” que contiene aminoácidos que forman un núcleo hidrofóbico necesario para la interacción con otras proteínas en su función como chaperona (Kumar *et al.*, 2022; Ohtaki, 2010).

En el modelo de interacción entre TcARM y TcCAL1, se evidenció que TcARM adopta estructuras de α -hélices conformadas por las repeticiones en tándem de 42 aminoácidos característicos de las proteínas con motivos ARM. Los resultados del ensayo de doble híbrido indicaron que TcCAL1 se une a TcARM en el extremo C-terminal. En contraste con esta observación, la predicción realizada por *AlphaFold2* con la proteína completa, sugiere que esta interacción es más probable en una cavidad formada por TcARM, situada más cerca del extremo N-terminal. Un dato interesante es el hecho de que la región identificada en el ensayo de doble híbrido, según la base de datos Uniprot, se predice con topología citosólica, mientras que la región N-terminal presenta una topología extracelular o secretada. Esto plantea el interrogante de si la interacción de TcARM está relacionada con TcCAL1 secretada, especialmente dado que TcARM podría también modificarse por palmitoilación (Ver anexos, Fig. 38), según la predicción *in silico*.

Otro de los objetivos de este trabajo involucró el estudio de la capacidad de unión a Ca^{2+} por TcCAL1. La mayoría de las proteínas que tienen esta función lo hacen a través de motivos *EF-hand*, que son estructuras altamente conservadas y directamente asociadas a la unión del catión (Hebenstreit & Ferreira, 2005). El motivo *EF-hand* está bien caracterizado, y consta de 12 aminoácidos que se nombran por la posición en la

secuencia y el eje en el plano espacial y en los residuos que participan en la unión del catión con los oxígenos de grupos carboxilo de las posiciones 1 (X), 3 (Y), 5 (Z) y 12 (–Z) y puentes de hidrógeno con una molécula de agua en el residuo 9 (–X) (Grabarek, 2011; Ogunrinde *et al.*, 2017). Además, un residuo de glicina en la posición 6, genera una torsión que produce que el bucle se enrolle alrededor del Ca^{2+} . En la mayoría de los *EF-hand*, el residuo 12 suele ser un ácido glutámico (E) y la sustitución por ácido aspártico (D) disminuye la afinidad de unión de Ca^{2+} y favorece la unión de iones Mg^{2+} (Bombardi *et al.*, 2020; Carlström & Chazin, 1993; Gifford *et al.*, 2007).

En el análisis estructural *in silico* de los motivos *EF-hand* de TcCAL1, se pudo observar que el motivo EF-1, conserva la mayoría de los residuos que participan en la coordinación de ion, bien sea por conservación total del residuo o por un cambio conservado. La posición 12 está representada por un residuo de ácido aspártico (Asp, D). Por otro lado, el motivo EF-2 conserva sólo dos de los aminoácidos más relevantes del bucle de unión a Ca^{2+} . Sin embargo, el EF-2 presenta un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 12. Aunque los motivos *EF-hand* de TcCAL1 exhiben diferencias sustanciales con el motivo canónico, el modelado de la estructura de TcCAL1 y las predicciones de unión a Ca^{2+} con los servidores COACH y COFACTOR apuntan a la capacidad de TcCAL1 de unir Ca^{2+} . De hecho, los predictores no sugirieron la posibilidad de unión a Mg^{2+} del EF-1 de TcCAL1. Por otro lado, el modelado de la estructura tridimensional de TcCAL1 con Ca^{2+} muestra la interacción del ion con los residuos del bucle de EF-1 y EF-2, demostrando la factibilidad y participación de estos residuos en la unión de Ca^{2+} .

Existen varios tipos de *EF-hand* no canónicos que son capaces de unir Ca^{2+} . El grupo con más similitudes al presentado por TcCAL1 conserva un bucle de 12 aminoácidos típicos, pero no usa los residuos canónicos para la coordinación del ion (Gifford *et al.*, 2007). En este último, un grupo de al menos un 10% de las proteínas presentan ácido aspártico en la posición 12. Este residuo provoca que la estructura sea más pequeña y más compacta, lo que tiene como consecuencia que el *EF-hand* también presente afinidad por Mg^{2+} (Wingard *et al.*, 2005). Este tipo de proteínas con *EF-hand* no canónicos han sido encontradas y caracterizadas en humanos, *Arabidopsis thaliana* y el cefalocordado del género *Amphioxus* (Cook *et al.*, 1993; Gentry *et al.*, 2005; Nagae *et al.*, 2003). El caso de TcCAL1 podría tratarse de un *EF-hand* no canónico conteniendo un bucle de 12 aminoácidos de longitud, con ciertos residuos conservados y una

estructura tridimensional que se ajusta a la coordinación de Ca^{2+} . La afinidad por Ca^{2+} y Mg^{2+} debe ser explorada experimentalmente.

En este trabajo, la capacidad de unión a Ca^{2+} por TcCAL1 fue estudiada también experimentalmente, a través de las técnicas espectroscópicas de DC y RMN, así como también por ensayos con indicadores fluorescentes. El DC y resonancia magnética nuclear son técnicas precisas para examinar la unión del calcio a *EF-hand*. Los enlaces peptídicos en las proteínas son ópticamente activos y la elipticidad que exhiben cambia según la conformación local de la molécula. Las estructuras secundarias de las proteínas pueden analizarse utilizando la región de luz UV lejano (190-250 nm). Las conformaciones ordenadas de hélices α , láminas β , giros β y hélices aleatorias tienen espectros característicos. En el caso de las proteínas que unen Ca^{2+} , se ha demostrado que hay un aumento que puede ser medible en la elipticidad en 222 nm tras la adición de Ca^{2+} . Este aumento es consistente con una situación estructural, un cambio inducido por la unión del catión (Hebenstreit & Ferreira, 2005). En el espectro de UV-cercano (250-300 nm), se puede obtener información acerca de la estructura terciaria de la proteína especialmente del cambio de posiciones en grupos aromáticos. En el caso de TcCAL1, los espectros de CD tanto UV-cercano como UV-lejano no mostraron cambios sustanciales cuando se obtuvieron los espectros en presencia o ausencia de Ca^{2+} . En el primer experimento realizado hay un pequeño cambio de la absorción de α -hélices (208 y 220 nm) en el UV-lejano en presencia de EGTA, que podría significar que la TcCAL1 experimenta un cambio muy sutil en su estructura secundaria. Luego, la proteína TcCAL1 se trató con la resina Chelex® para eliminar el Ca^{2+} de la muestra y aumentar las diferencias observadas con la proteína en ausencia del ion. Sin embargo, en un segundo experimento esta diferencia no pudo ser ampliada. En el caso de UV-cercano ninguno de los espectros mostró diferencias en presencia o ausencia de Ca^{2+} , aun cuando TcCAL1 tiene aminoácidos aromáticos en los bucles de unión al ion.

Por otro lado, los espectros obtenidos con la técnica de RMN, en donde se puede detectar los cambios en la resonancia de los protones de un grupo específico de moléculas, tampoco se observaron cambios sustanciales entre los espectros de grupos amidas y metilos para TcCAL1 en presencia o ausencia de Ca^{2+} . Estos resultados en conjunto indican que los cambios en la estructura secundaria y terciaria de TcCAL1 fueron muy sutiles o casi imperceptibles en presencia de Ca^{2+} , al intentar evidenciarlo mediante estas técnicas. Este comportamiento se ha reportado en algunas proteínas de unión a Ca^{2+} (Sastry *et al.*, 1998; Sia *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2005).

En este punto es importante cuestionar si la etiqueta de seis histidinas (x6His) de TcCAL1 puede influir en el análisis a través de DC y RMN. Una de las etiquetas usadas para purificar y detectar proteínas recombinantes es x6His debido, entre muchas ventajas metodológicas, a su tamaño y a que raramente interfiere con la función y estructura de la proteína (Costa *et al.*, 2014; Kimple *et al.*, 2013; Wingfield, 2015). Sin embargo, en algunos casos, la etiqueta afecta el estado de oligomerización (Kolaj-Robin *et al.*, 2013) o puede cambiar la conformación del sitio activo de las proteínas (Chant *et al.*, 2005). Estos efectos, en muchos casos, dependen de si la etiqueta está en el extremo N o C terminal (Mason *et al.*, 2002). Para realizar análisis por DC, se recomienda la eliminación de la etiqueta de x6His si hay evidencia de que afecta la estabilidad y el plegamiento de la proteína (Kelly *et al.*, 2005). También, se deben evitar las altas concentraciones de imidazol o histidina para análisis en el UV lejano, ya que altera la adquisición de los espectros (Ranjbar & Gill, 2009). Con respecto a estudios específicos de proteínas de unión a Ca^{2+} con etiqueta de x6His, la tendencia es eliminar las seis histidinas para realizar el análisis (Garcia-Marchan *et al.*, 2009; Hoyer *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2009). Sin embargo, un estudio relacionó específicamente el efecto de la etiqueta x6His en las propiedades físicas de la parvalbumina (PA), una proteína de unión a Ca^{2+} . Este análisis determinó que la unión de Ca^{2+} por la proteína en presencia o ausencia de x6His no fue afectada (Vologzhannikova *et al.*, 2019). En el caso del efecto del x6His en los análisis RMN, entre la bibliografía consultada hay pocos datos sobre estas condiciones específicas. No obstante, algunos trabajos no consideran que la etiqueta x6His tenga algún efecto negativo en los estudios por RMN (Yee *et al.*, 2002, 2014). Asimismo, un estudio de una metaloenzima que une zinc y Ca^{2+} , no mostró diferencias en la adquisición de espectros RMN, cuando los compararon con la enzima sin la etiqueta x6His (Kutyshenko *et al.*, 2019). Por otro lado, si bien el aminoácido histidina tiene la capacidad de unirse a cationes divalentes metálicos, como el Ca^{2+} , su afinidad es menor en comparación con los aminoácidos ácido aspártico o ácido glutámico, los cuales forman los bucles en los motivos *EF-hand* y tienen una mayor afinidad para unir el catión (Tang & Skibsted, 2016). La evidencia basada en la bibliografía muestra que en este estudio la etiqueta de x6His probablemente no tuvo influencia en los resultados obtenidos.

La capacidad de unión a Ca^{2+} por TcCAL1 también fue estudiada cualitativamente utilizando el indicador Quin-2. Esta técnica descrita por Tatsumi *et al.*, (1997) ha sido empleada en varios trabajos para la detección de proteínas que unen Ca^{2+} a partir de homogenatos proteicos separados en membranas de PVDF (Dietrich *et al.*, 2011; Rebrik

et al., 2012; Tatsumi *et al.*, 1997). El fundamento está basado en la ventaja ofrecida por el indicador Quin-2, con alta afinidad por Ca^{2+} ($K_d=115 \text{ nM}$), de interactuar fuertemente con complejos Ca^{2+} -proteínas (Bryant, 1985). La señal de fluorescencia obtenida para TcCAL1 con este ensayo, sugiere que une Ca^{2+} . Esta afirmación se respalda en la presencia de señal en proteínas, calmodulina y sorcina, que contienen 4 y 5 motivos *EF-hands*, respectivamente y la ausencia de fluorescencia en los controles negativos. Además, la señal obtenida disminuyó cuando la membrana fue incubada con EGTA, un quelante de Ca^{2+} .

Ahora bien, si TcCAL1 tiene la capacidad de unir Ca^{2+} , ¿Por qué no se observan cambios conformacionales detectables mediante técnicas como DC y RMN?. En este contexto, varios estudios muestran la existencia de proteínas que contrariamente a los sensores de Ca^{2+} , prácticamente no experimentan cambios conformacionales tras la unirse al ion. Este grupo de proteínas se conocen como *buffers* o moduladores de Ca^{2+} (Gifford *et al.*, 2007; Ogunrinde *et al.*, 2017) y está representado por algunas proteínas S100, que también funcionan como sensores, parvalbumina (PA) en sus isoformas α y β , calbindina-D28K y calretinina, todas pertenecientes a la familia de proteínas con motivos tipo *EF-hand* (Berggård *et al.*, 2002; Eberhard & Erne, 1994; Schwaller, 2020).

La presencia de TcCAL1 en el citoplasma, actuando como una proteína de unión al Ca^{2+} , plantea la interrogante sobre los niveles de este ion en los parásitos que sobreexpresan TcCAL1 y si esta proteína tiene la capacidad de modificarlos. Nuestros resultados mostraron que estos parásitos mantienen una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles fisiológicos ($\sim 100 \text{ nM}$). Esto lleva a pensar que la proteína sobreexpresada no logra quelar el ion y provocar la disminución de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en las condiciones evaluadas. También, es posible que los cambios inducidos por la sobreexpresión de TcCAL1, en el marco de la dinámica intracelular, no hayan podido ser detectados mediante los métodos empleados en este estudio.

En tripanosomátidos, la concentración intracelular de Ca^{2+} en basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está reportada en el rango de 20 a 100 nM (Benaim *et al.*, 2020; Docampo & Huang, 2015), mientras que las constantes de disociación de prácticamente todos los *buffers* de Ca^{2+} conocidos son un orden de magnitud más alto (aproximadamente 200-1500 nM). Por lo tanto, en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal, los *buffers* de Ca^{2+} están principalmente en su estado apo, listos para unirse a iones de Ca^{2+} cuando se aumenta su concentración intracelular. En este aspecto, TcCAL1 posee características de un *buffer/modulador* de Ca^{2+} al presentar

cambios conformacionales indetectables y ser una proteína con una vasta presencia en el citosol de los parásitos.

En conjunto esto reafirma la importancia del Ca^{2+} en todos los procesos celulares de los que participa en el parásito y de toda la maquinaria intracelular avocada a su señalización y homeostasis. La capacidad del *buffer* para unir y liberar Ca^{2+} (cinética de tamponamiento de la proteína) y su movilidad son características cruciales en las proteínas con esta función, especialmente dada la velocidad de las señales intracelulares. Esta particularidad, nos lleva a pensar en el hecho de que el parásito podría buscar diferentes vías para mantener la homeostasis del catión frente a los cambios que puede inducir la TcCAL1. No obstante, la aplicación de la técnica de fluorescencia para investigar los niveles intracelulares de Ca^{2+} *in vitro*, sentó las bases para estudios posteriores que incluyen el uso de ionóforos como la ionomicina, los cuales inducen la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares, permitiendo así analizar el restablecimiento de las concentraciones basales del ion.

Finalmente, los cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} durante los procesos de diferenciación e invasión en los parásitos se correlacionan con la mayor expresión endógena de TcCAL1 detectada en las formas tripomastigotes. Las características bioquímicas de esta proteína podrían estar relacionadas con la potencial función de *buffer*/sensor de Ca^{2+} en el citosol del parásito, a disposición de las respuestas abruptas y temporales que ocurren en los procesos del ciclo de vida del parásito en los cuales se encuentra involucrado este ion.

Conclusiones y perspectivas

Este trabajo doctoral permitió estudiar a TcCAL1, una nueva proteína de unión a Ca^{2+} de *T. cruzi*, del cual se concluye:

- ✓ TcCAL1 posee motivos *EF-hand* no canónicos y une Ca^{2+} .
- ✓ TcCAL1 se expresa en *T. cruzi*, tiene una localización citosólica en epimastigotes, amastigotes axénicos y tripomastigotes y se expresa de forma diferencial siendo las formas infectivas las que expresan mayores niveles de la proteína.
- ✓ TcCAL1 podría interactuar con proteínas con dominios PFD y ARM

- ✓ TcCAL1 podría estar involucrada en los procesos de diferenciación e invasión de *T. cruzi*.
- ✓ La sobreexpresión de TcCAL1 no resultó en la disminución de $[Ca^{2+}]$ intracelular en epimastigotes.

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se pueden plantear serie de perspectivas para estudios futuros:

- Exploración de los motivos *EF-hand* no canónicos de TcCAL1: el análisis *in silico* y los resultados experimentales nos impulsan a investigar más a fondo la estructura y función de los motivos *EF-hand* no canónicos de TcCAL1.
- Regulación de la expresión de TcCAL1: dado que TcCAL1 se expresa diferencialmente en algunas etapas del ciclo de vida del parásito, sería interesante investigar los mecanismos moleculares que controlan su expresión. Se podrían plantear experimentos para indagar sobre su rol como factor de transcripción y señalización celular en la regulación de la expresión de TcCAL1, y cómo esto afecta los procesos de diferenciación e invasión de *T. cruzi*.
- Caracterización de las interacciones: la identificación de proteínas que poseen dominios PFD y ARM como pares de asociación a TcCAL1, sugieren que esta última está implicada en una red de interacción proteica. Sería relevante confirmar estas interacciones para comprender su papel en la virulencia y patogénesis de *T. cruzi* por medio de IP, y espectrometría de masas o ensayos de proximidad dependiente de biotina o BirA (*proximity dependent biotin identification assays*)
- Profundizar los estudios sobre la función de TcCAL1 en la diferenciación e invasión de *T. cruzi*: es necesario utilizar cepas más virulentas de *T. cruzi* y que cumplan el ciclo de vida completo, a las que se pueda editar para obtener el silenciamiento génico por CRISPR/CAS9 de los dos alelos de *tccal1*, para caracterizar el/los fenotipos resultantes, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* en un modelo murino.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren varias direcciones prometedoras para futuras investigaciones sobre TcCAL1 y su papel en la biología de *T. cruzi*. Estos puntos llevan a plantear hipótesis que abren nuevas oportunidades para comprender mejor la función de esta proteína y su contribución a la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

5. Anexos

Predicción de palmitoilación de TcARM

La modificación postraducciona por palmitoilación en TcARM, se exploró desde un punto de vista *in silico*. El software CSS-Palm 4.0 predice la potencial palmitoilación de 5 residuos de cisteínas respectivamente. El score es el valor de confianza de la predicción que puede tener valores desde 1 a 10, siendo 10 el valor de mayor confianza.

CSS-Palm 4.0 - Palmitoylation Sites Prediction				
File Tools Help				
Predicted Sites				
ID	Position	Peptide	Score	Cutoff
TcCLB.511421.200	4	***MSK C EKFLHEL	20.438	10.722
TcCLB.511421.200	63	VLGAMGL C QTNCSS	4.478	3.717
TcCLB.511421.200	559	LLKSSES C AAINAFK	4.133	3.717
TcCLB.511421.200	856	LLAVLL S CEELTVVL	4.724	3.717
TcCLB.511421.200	960	MKLLLEN C QTAVVC	5.826	2.412

TcARM (TcCLB.511421.200)

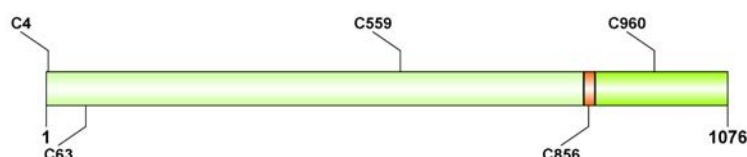


Figura 38. Predicción de sitios palmitoilables de TcARM con el servidor CSS-Palm 4.0. se señalan las cisteínas potencialmente palmitoilables a lo largo de la secuencia de TcARM. representadas por la posición entre paréntesis. El color verde claro representa una topología no citoplasmática, la sección naranja corresponde a un dominio transmembranal y la sección verde brillante (c-terminal) corresponde a una topología citoplasmática predichas por el servidor *Phobius* dentro de la base de datos de proteínas Uniprot (<https://www.uniprot.org>).

Purificación de TcCAL1x6His a partir de epimastigotes mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA

Con el objetivo de comprobar la presencia de la etiqueta de 6 histidinas (x6his) en la proteína TcCAL1 sobreexpresada por el parásito. Se realizó la purificación de TcCAL1x6His a partir de epimastigotes de la cepa CL, utilizando el kit Ni-NTA *Spin Column* (Qiagen, USA. Catálogo # ID: 31314). La purificación se realizó en condiciones desnaturalizantes con 8 M de urea, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente:

- Se partió de *precipitados* de 2×10^8 de epimastigotes cepa CL control (con el vector pTREX) y CL-CAL1 (sobreexpresantes de TcCAL1x6His). Los extractos proteicos

totales se obtuvieron por lisis de los parásitos en 800 µL de *buffer* B (8M urea, 0.1 M de NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl pH 8). El lisado clarificado se obtuvo por centrifugación a 13000 *xg* durante 30 min y se cargó en mini columnas Ni-NTA previamente equilibras con el mismo *buffer*. Se colectó la fracción no unida a la resina (FNU) por centrifugación a 700 *xg* por 2 min. La resina se lavó 2 veces con *buffer* C (8M urea, 0.1 M de NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl pH 6.3) y seguidamente, se realizaron 5 eluciones con *buffer* C (8M urea, 0.1 M de NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl pH 4.3) centrifugando a 700 *xg* durante 2 minutos.

- Todas las fracciones se colectaron y se separaron 40 µL para realizar un *western blot* con el anticuerpo anti-CAL1.

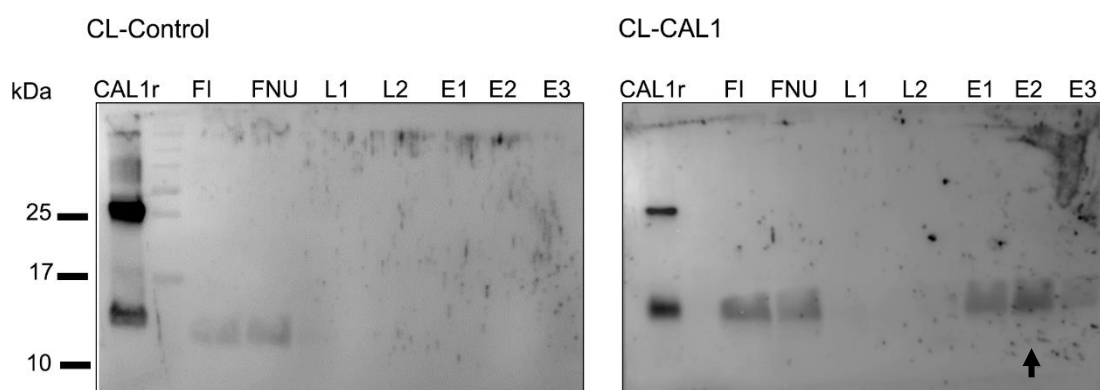


Figura 39. Purificación de TcCAL1x6His a partir de epimastigotes. Se muestra un *western blot* revelado con el anticuerpo anti-CAL1. Se purificó la proteína empleando mini columnas Ni-NTI a partir de lisados proteicos de epimastigotes de la cepa CL. Se utilizó como control cultivos de la cepa CL portadores del plásmido pTREX (CL-control) y sobreexpresantes de TcCAL1x6His (CL-CAL1). CAL1r: TcCAL1x6His recombinante de *E. coli*. FI: fracción inicial (lisado clarificado), FNU: fracción no unida a la resina, L1-L2: Lavados 1 y 2, E1-E4: Eluidos 1 al 4. kDa: kilodalton

La proteína se detectó en los eluidos obtenidos a partir de los extractos proteicos de CL-CAL1, en el tamaño esperado ~12 kDa y no fue detectada en los epimastigotes CL-Control, como se esperaba.

Identificación de proteínas asociadas a TcCAL1 por co-inmunoprecipitación (CoIP)

Se realizó un abordaje preliminar para la identificación de proteínas asociadas a TcCAL1 utilizando la técnica de CoIP. Se empleó el ensayo comercial de co-

inmunoprecipitación Pierce™ (Thermo Scientific, USA. catálogo #26147) siguiendo las especificaciones del fabricante, con algunas modificaciones en el siguiente protocolo:

- Obtención de lisados de parásitos

Se utilizó un cultivo de 1×10^9 epimastigotes de la cepa Y WT. Los parásitos se recuperaron y se realizaron 5 lavados por centrifugación a 3000 xg durante 10 min con PBS pH 7.4. Los parásitos se incubaron con el *crosslinker* DSP (ditiobis(succinimidil propionato)) 5 mM durante 30 min a 28 °C. La reacción de entrecruzamiento de proteínas se detuvo utilizando *buffer* 15 mM Tris-HCl pH 7,5 por 15 min en agitación. Luego, los parásitos se lavaron 6 veces por centrifugaciones sucesivas con PBS pH 7.4. Para obtener el lisado proteico, el precipitado de parásitos se resuspendió en *buffer* de lisis/lavado (0.025M Tris-HCl, 0.15M NaCl, 1% NP-40, 5% glicerol, 1X inhibidores de proteasas; pH 7.4.) y se sometió a 2 ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación a temperatura ambiente. Se incubó 1 mg de proteína total del lisado soluble con 80 μ L de la *Pierce™ Control Agarose Resin* (resina en suspensión) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. La mezcla resina/lisado se incubó durante 1 h a 4 °C en agitación suave. La columna se centrifugó a 1000 xg durante 1 min y el lisado pre-clarificado obtenido como percolato se recuperó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

- Acople de antisueros a la resina

Se utilizaron 60 μ L del antisuero anti-TcCAL1 y del antisuero pre-inmune (60 μ g de IgG aproximadamente) para acoplar a la resina de proteína A/G agarosa. Se utilizaron 450 μ M de DSS (Disuccinimidyl suberate) (Pierce®, USA. Cat. #21555) para realizar el *crosslinking* del anticuerpo a la resina.

- Inmunoprecipitación de TcCAL1 con interactores

Para la inmunoprecipitación, se separaron dos alícuotas conteniendo 1 mg de pre-clarificado y se incubaron en dos columnas independientes conteniendo las resinas con los antisueros crosslinkeados, anti-TcCAL1 y el suero control (suero pre-inmune), respectivamente. Para cada columna conteniendo la resina de proteína A/G agarosa con el suero anti-TcCAL1 o suero pre-inmune crosslinkeado, se utilizó 1 mg de proteína total estimada en el lisado pre-clarificado. La mezcla resina-antisuero/lisado se incubó ON a 4° C en agitación. Se recuperó el percolato por centrifugación a 1000 xg por 1 min y se lavó 3 veces la columna con 250 μ L de *buffer* de lisis/lavado para IP. Seguidamente, la columna se lavó una vez con 1X *conditioning*

buffer (*buffer* con pH neutral) y el eluido se realizó con 60 µL totales de *buffer* de elución pH 2.8 en dos fases, una de 10 µL y otra de 50 µL, mediante centrifugación a 1000xg por 1 min. Los eluidos se neutralizaron con 5 µL de *buffer* 1M Tris-HCl pH 9.5 y se concentraron por *speed vaccum*.

Finalmente, Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida y se analizaron por espectrometría de masas en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masas de la Universidad de Buenos Aires (UBA), CEQUIBIEM-UBA. Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa *Proteome Discoverer*, utilizando la base de datos del proteoma de *Trypanosoma cruzi* (CL Brener) disponible en la base de datos UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>).

Se obtuvieron 2917 péptidos correspondientes a 400 proteínas, entre las cuales se encuentran TcCAL1 y a una proteína con dominios de tipo prefoldina (número de acceso TriTrypDB: TcCLB.510629.430). También, se identificaron proteínas que tienen relevancia en procesos de invasión de parásito y proteínas asociadas al núcleo. No se identificaron proteínas con dominios armadillo. Algunas proteínas identificadas se clasificaron en grupos funcionales (tabla 10).

Tabla 10. Proteínas identificadas por categorías funcionales en experimento preliminar de ColP con lisados de epimastigotes de *T. cruzi*.

Categoría funcional	Proteínas identificadas
Metabolismo	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha (EC 1.2.4.1) Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42) alanine transaminase (EC 2.6.1.2) malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) phosphopyruvate hydratase (EC 4.2.1.11) Protein tyrosine phosphatase-like protein, putative Protein tyrosine phosphatase, putative Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1) NADH-dependent fumarate reductase, putative Glucosamine-6-phosphate isomerase (EC 3.5.99.6) (Glucosamine-6-phosphate deaminase) Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49) Glutathione peroxidase Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) Glycerate kinase

Citoesqueleto	Kinesin-like protein Tubulin beta chain Tubulin alpha chain Kinetoplastid membrane protein KMP-11, putative
Biosíntesis y direccionamiento Catabolismo/proteólisis	Proteasome regulatory ATPase subunit 1, putative Proteasome regulatory ATPase subunit, putative Proteasome regulatory non-ATPase subunit 3, putative Proteasome regulatory non-ATPase subunit 2, putative Heat shock 70 kDa protein, Elongation factor 1-alpha Elongation factor 2, putative Elongation factor TU, putative Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit, putative
Transporte de electrones y antioxidantes	Cytochrome c oxidase assembly protein Cytochrome c oxidase assembly protein PET191 Cytochrome c oxidase subunit 10, putative Cytochrome C oxidase subunit IV, putative Cytochrome c oxidase subunit V, putative
Nucleares	Nucleolar protein, putative Histone H2B Histone H4 GTP-binding nuclear protein
Plegamiento	Prefoldin subunit, putative
Proteínas que unen Ca²⁺	Calmodulin, putative Centrin, putative EF-hand domain-containing protein (TcCAL1) Calpain cysteine peptidase, putative Calpain-like cysteine peptidase, putative
Otras proteínas de interés	Small GTP-binding protein Rab1, putative Clathrin heavy chain Dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative Trans-sialidase

Composición de aminoácidos de TcCAL1x6His.

Se obtuvo la composición de aminoácidos de TcCAL1x6His a través de la herramienta de ProtScale de Expasy (<https://www.expasy.org/resources/protscale>).

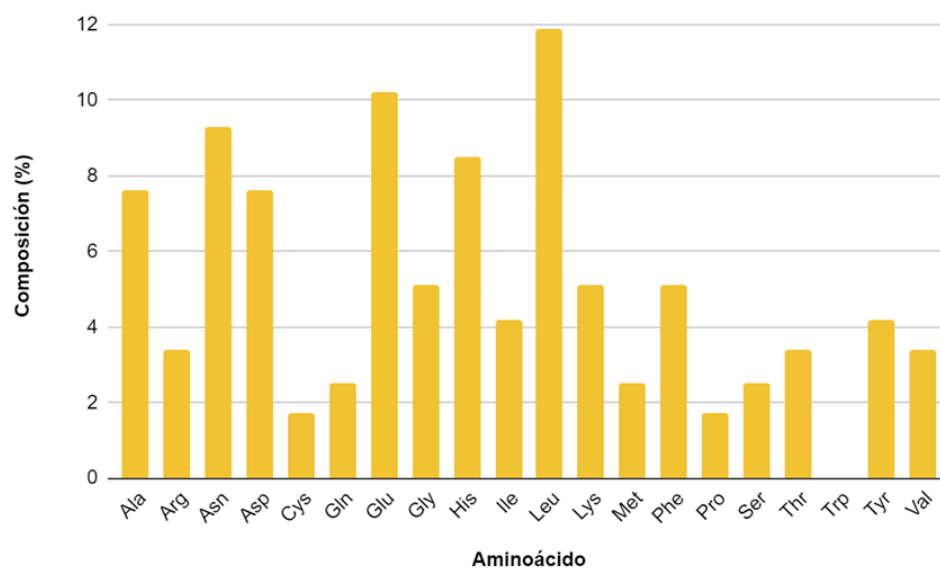


Figura 40. Composición de aminoácidos en la secuencia de TcCAL1.

6. Bibliografía

- Abras, A., Ballart, C., Fernández-Arévalo, A., Pinazo, M.-J., Gascón, J., Muñoz, C., Gállego, M., 2022. Worldwide Control and Management of Chagas Disease in a New Era of Globalization: a Close Look at Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *Clin Microbiol Rev* 35, e00152-21. <https://doi.org/10.1128/cmr.00152-21>
- Aicart-Ramos, C., Valero, R.A., Rodriguez-Crespo, I., 2011. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 2981–2994. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.009>
- Akaki, K., Mino, T., Takeuchi, O., 2022. DSP-crosslinking and Immunoprecipitation to Isolate Weak Protein Complex. *Bio Protoc* 12, e4478. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4478>
- Alsford, S., Turner, D.J., Obado, S.O., Sanchez-Flores, A., Glover, L., Berriman, M., Hertz-Fowler, C., Horn, D., 2011. High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res.* 21, 915–924. <https://doi.org/10.1101/gr.115089.110>
- Araújo, P.R., Teixeira, S.M., 2011. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 257–266. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000300002>
- Araya, J.E., Cornejo, A., Orrego, P.R., Cordero, E.M., Cortéz, M., Olivares, H., Neira, I., Sagua, H., Franco Da Silveira, J., Yoshida, N., González, J., 2008. Calcineurin B of the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is involved in cell invasion. *Microbes and Infection* 10, 892–900. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.05.003>
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B.P., Carrington, M., Depledge, D.P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M.J., Gingle, A., Grant, G., Harb, O.S., Heiges, M., Hertz-Fowler, C., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J.C., Kraemer, E., Li, W., Logan, F.J., Miller, J.A., Mitra, S., Myler, P.J., Nayak, V., Pennington, C., Phan, I., Pinney, D.F., Ramasamy, G., Rogers, M.B., Roos, D.S., Ross, C., Sivam, D., Smith, D.F., Srinivasamoorthy, G., Stoeckert, C.J., Subramanian, S., Thibodeau, R., Tivey, A., Treatman, C., Velarde, G., Wang, H., 2010. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Research* 38, D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp851>
- Atwood, J.A., 2005. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. *Science* 309, 473–476. <https://doi.org/10.1126/science.1110289>
- Barbosa, H.S., Meirelles, M.N.L., 1995. Evidence of Participation of Cytoskeleton of Heart Muscle Cells during the Invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Struct. Funct.* 20, 275–284. <https://doi.org/10.1247/csf.20.275>
- Barisón, M.J., Rapado, L.N., Merino, E.F., Furusho Pral, E.M., Mantilla, B.S., Marchese, L., Nowicki, C., Silber, A.M., Cassera, M.B., 2017. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J. Biol. Chem.* 292, 8964–8977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778522>
- Barrias, E.S., De Carvalho, T.M.U., De Souza, W., 2013. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00186>
- Batista, C.M., Saad, F., Ceccoti, S.P.C., Eger, I., Soares, M.J., 2018. Subcellular localisation of FLAG tagged enzymes of the dynamic protein S-palmitoylation cycle of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180086>
- Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S.P., Cordero, E.M., Marques, A.F., Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., Da Silveira, J.F., Almeida, I.C., 2013. Proteomic Analysis of

Trypanosoma cruzi Secretome: Characterization of Two Populations of Extracellular Vesicles and Soluble Proteins. J. Proteome Res. 12, 883–897. <https://doi.org/10.1021/pr300947g>

Ben Chaabene, R., Lentini, G., Soldati-Favre, D., 2021. Biogenesis and discharge of the rhoptries: Key organelles for entry and hijack of host cells by the Apicomplexa. Molecular Microbiology 115, 453–465. <https://doi.org/10.1111/mmi.14674>

Benaim, B.G., Garcia, C.R.S., 2011. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. Trop Biomed 28, 471–481.

Benaim, G., Losada, S., Gadelha, F.R., Docampo, R., 1991. A calmodulin-activated (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase is involved in Ca²⁺ transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. Biochemical Journal 280, 715–720. <https://doi.org/10.1042/bj2800715>

Benaim, G., Paniz-Mondolfi, A.E., Sordillo, E.M., Martinez-Sotillo, N., 2020. Disruption of Intracellular Calcium Homeostasis as a Therapeutic Target Against *Trypanosoma cruzi*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10, 46. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00046>

Benaim, G., Villalobo, A., 2002. Phosphorylation of calmodulin: Functional implications. European Journal of Biochemistry 269, 3619–3631. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03038.x>

Berggård, T., Miron, S., Önnérjörd, P., Thulin, E., Åkerfeldt, K.S., Enghild, J.J., Akke, M., Linse, S., 2002. Calbindin D28k Exhibits Properties Characteristic of a Ca²⁺ Sensor. Journal of Biological Chemistry 277, 16662–16672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200415200>

Berná, L., Greif, G., Pita, S., Faral-Tello, P., Díaz-Viraqué, F., Souza, R.D.C.M.D., Vallejo, G.A., Alvarez-Valin, F., Robello, C., 2021. Maxicircle architecture and evolutionary insights into *Trypanosoma cruzi* complex. PLoS Negl Trop Dis 15, e0009719. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009719>

Berná, L., Rodriguez, M., Chiribao, M.L., Parodi-Talice, A., Pita, S., Rijo, G., Alvarez-Valin, F., Robello, C., 2018. Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. Microbial Genomics 4. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000177>

Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol 4, 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>

Bertolini, M.S., Chiurillo, M.A., Lander, N., Vercesi, A.E., Docampo, R., 2019. MICU1 and MICU2 Play an Essential Role in Mitochondrial Ca²⁺ Uptake, Growth, and Infectivity of the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*. mBio 10, e00348-19, [/mbio/10/3/mBio.00348-19.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.00348-19). <https://doi.org/10.1128/mBio.00348-19>

Billington, K., Halliday, C., Madden, R., Dyer, P., Barker, A.R., Moreira-Leite, F.F., Carrington, M., Vaughan, S., Hertz-Fowler, C., Dean, S., Sunter, J.D., Wheeler, R.J., Gull, K., 2023. Genome-wide subcellular protein map for the flagellate parasite *Trypanosoma brucei*. Nat Microbiol 8, 533–547. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01295-6>

Bombardi, L., Pedretti, M., Conter, C., Dominici, P., Astegno, A., 2020. Distinct Calcium Binding and Structural Properties of Two Centrin Isoforms from *Toxoplasma gondii*. Biomolecules 10, 1142. <https://doi.org/10.3390/biom10081142>

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brown, R.W.B., Sharma, A.I., Engman, D.M., 2017. Dynamic protein S -palmitoylation mediates parasite life cycle progression and diverse mechanisms of virulence. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 52, 145–162. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1287161>

- Bryant, D.T.W., 1985. Quin 2: the dissociation constants of its Ca^{2+} and Mg^{2+} complexes and its use in a fluorimetric method for determining the dissociation of Ca^{2+} -protein complexes. *Biochemical Journal* 226, 613–616. <https://doi.org/10.1042/bj2260613>
- Bryant, P., Pozzati, G., Elofsson, A., 2022. Improved prediction of protein-protein interactions using AlphaFold2. *Nat Commun* 13, 1265. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28865-w>
- Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P., Andrews, N.W., 1997. A Cytosolic Serine Endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* Is Required for the Generation of Ca^{2+} Signaling in Mammalian Cells. *The Journal of Cell Biology* 136, 609–620. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.3.609>
- Cabrera, A., Herrmann, S., Warszta, D., Santos, J.M., John Peter, A.T., Kono, M., Debrouver, S., Jacobs, T., Spielmann, T., Ungermann, C., Soldati-Favre, D., Gilberger, T.W., 2012. Dissection of Minimal Sequence Requirements for Rhoptry Membrane Targeting in the Malaria Parasite. *Traffic* 13, 1335–1350. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01394.x>
- Callejas-Hernández, F., Herreros-Cabello, A., Del Moral-Salmoral, J., Fresno, M., Gironès, N., 2021. The Complete Mitochondrial DNA of *Trypanosoma cruzi*: Maxicircles and Minicircles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 672448. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.672448>
- Cámara, M. de L.M., Balouz, V., Centeno Cameán, C., Cori, C.R., Kashiwagi, G.A., Gil, S.A., Macchiaverna, N.P., Cardinal, M.V., Guaimas, F., Lobo, M.M., de Lederkremer, R.M., Gallo-Rodriguez, C., Buscaglia, C.A., 2019. *Trypanosoma cruzi* surface mucins are involved in the attachment to the *Triatoma infestans* rectal ampoule. *PLoS Negl Trop Dis* 13, e0007418. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007418>
- Cánepa, G.E., Degese, M.S., Budu, A., Garcia, C.R.S., Buscaglia, C.A., 2012. Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Biochemical Journal* 444, 211–218. <https://doi.org/10.1042/BJ20120074>
- Carlström, G., Chazin, W.J., 1993. Two-dimensional ^1H Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Half-saturated (Ca^{2+})₁ State of Calbindin D9k. *Journal of Molecular Biology* 231, 415–430. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1291>
- Carrión, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellström, B., Naranjo, J.R., 1999. DREAM is a Ca^{2+} -regulated transcriptional repressor. *Nature* 398, 80–84. <https://doi.org/10.1038/18044>
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>
- Chant, A., Kraemer-Pecore, C.M., Watkin, R., Kneale, G.G., 2005. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expression and Purification* 39, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.017>
- Chao, C., Leone, J.L., Vigliano, C.A., 2020. Chagas disease: Historic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1866, 165689. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165689>
- Chávez, S., Urbaniak, M.D., Benz, C., Smircich, P., Garat, B., Sotelo-Silveira, J.R., Duhagon, M.A., 2021a. Extensive Translational Regulation through the Proliferative Transition of *Trypanosoma cruzi* Revealed by Multi-Omics. *mSphere* 6, e00366–21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00366-21>
- Chávez, S., Urbaniak, M.D., Benz, C., Smircich, P., Garat, B., Sotelo-Silveira, J.R., Duhagon, M.A., 2021b. Extensive Translational Regulation through the Proliferative Transition of *Trypanosoma*

- cruzi Revealed by Multi-Omics. *mSphere* 6, e00366-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00366-21>
- Chazin, W.J., 2011. Relating Form and Function of EF-Hand Calcium Binding Proteins. *Acc. Chem. Res.* 44, 171–179. <https://doi.org/10.1021/ar100110d>
- Chiurillo, M.A., Lander, N., Bertolini, M.S., Storey, M., Vercesi, A.E., Docampo, R., 2017. Different Roles of Mitochondrial Calcium Uniporter Complex Subunits in Growth and Infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *mBio* 8, e00574-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00574-17>
- Chiurillo, M.A., Lander, N., Bertolini, M.S., Vercesi, A.E., Docampo, R., 2019. Functional analysis and importance for host cell infection of the Ca^{2+} -conducting subunits of the mitochondrial calcium uniporter of *Trypanosoma cruzi*. *MBoC* 30, 1676–1690. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-03-0152>
- Chiurillo, M.A., Lander, N., Vercesi, A.E., Docampo, R., 2020a. IP3 receptor-mediated Ca^{2+} release from acidocalcisomes regulates mitochondrial bioenergetics and prevents autophagy in *Trypanosoma cruzi*. *Cell Calcium* 92, 102284. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102284>
- Chiurillo, M.A., Lander, N., Vercesi, A.E., Docampo, R., 2020b. IP3 receptor-mediated Ca^{2+} release from acidocalcisomes regulates mitochondrial bioenergetics and prevents autophagy in *Trypanosoma cruzi*. *Cell Calcium* 92, 102284. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102284>
- Coates, J., 2003. Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends in Cell Biology* 13, 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(03\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(03)00167-3)
- Contreras, V.T., Salles, J.M., Thomas, N., Morel, C.M., Goldenberg, S., 1985. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology* 16, 315–327. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90073-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90073-8)
- Cook, W.J., Jeffrey, L.C., Cox, J.A., Vijay-Kumar, S., 1993. Structure of a Sarcoplasmic Calcium-binding Protein from *Amphioxus* Refined at 2.4 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 229, 461–471. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1046>
- Cortez, M., Neira, I., Ferreira, D., Luquetti, A.O., Rassi, A., Atayde, V.D., Yoshida, N., 2003. Infection by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Forms Deficient in gp82 but Expressing a Related Surface Molecule, gp30. *Infect Immun* 71, 6184–6191. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6184-6191.2003>
- Corvi, M.M., 2011. Protein palmitoylation in protozoan parasites. *Front Biosci* S3, 1067. <https://doi.org/10.2741/211>
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L., 2014. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>
- Cronemberger-Andrade, A., Xander, P., Soares, R.P., Pessoa, N.L., Campos, M.A., Ellis, C.C., Grajeda, B., Ofir-Birin, Y., Almeida, I.C., Regev-Rudzki, N., Torrecilhas, A.C., 2020. *Trypanosoma cruzi*-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 99. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00099>
- D'Angelo, M.A., Montagna, A.E., Sanguineti, S., Torres, H.N., Flawiá, M.M., 2002. A Novel Calcium-stimulated Adenylyl Cyclase from *Trypanosoma cruzi*, Which Interacts with the Structural Flagellar Protein Paraflagellar Rod. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35025–35034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204696200>
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27, 1164–1165. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088>

- Dave, N., Cetiner, U., Arroyo, D., Fonbuena, J., Tiwari, M., Barrera, P., Lander, N., Anishkin, A., Sukharev, S., Jimenez, V., 2021. A novel mechanosensitive channel controls osmoregulation, differentiation, and infectivity in *Trypanosoma cruzi*. *eLife* 10, e67449. <https://doi.org/10.7554/eLife.67449>
- De Fuentes-Vicente, J.A., Santos-Hernández, N.G., Ruiz-Castillejos, C., Espinoza-Medinilla, E.E., Flores-Villegas, A.L., De Alba-Alvarado, M., Cabrera-Bravo, M., Moreno-Rodríguez, A., Vidal-López, D.G., 2023. What Do You Need to Know before Studying Chagas Disease? A Beginner's Guide. *TropicalMed* 8, 360. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070360>
- de Godoy, L.M.F., Marchini, F.K., Pavoni, D.P., Rampazzo, R. de C.P., Probst, C.M., Goldenberg, S., Krieger, M.A., 2012. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics* 12, 2694–2703. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200078>
- De Los Milagros Cámara, M., Bouvier, L.A., Miranda, M.R., Reigada, C., A. Pereira, C., 2013. Laboratory techniques to obtain different forms of *Trypanosoma cruzi*: applications to wild-type and genetically modified parasites. *FOLIA PARASIT* 60, 406–410. <https://doi.org/10.14411/fp.2013.042>
- De Pablos, L.M., Osuna, A., 2012. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. *Infect Immun* 80, 2258–2264. <https://doi.org/10.1128/IAI.06225-11>
- De Sousa, A.S., Vermeij, D., Ramos, A.N., Luquetti, A.O., 2024. Chagas disease. *The Lancet* 403, 203–218. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01787-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01787-7)
- De Souza, W., De Carvalho, T.M.U., Barrias, E.S., 2010. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology* 2010, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
- Debeljak, N., Feldman, L., Davis, K.L., Komel, R., Sytkowski, A.J., 2006. Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. *Analytical Biochemistry* 359, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.017>
- Di Noia, J.M., Buscaglia, C.A., De Marchi, C.R., Almeida, I.C., Frasch, A.C.C., 2002. A *Trypanosoma cruzi* Small Surface Molecule Provides the First Immunological Evidence that Chagas' Disease Is Due to a Single Parasite Lineage. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 401–413. <https://doi.org/10.1084/jem.20011433>
- Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M.L., Libisch, M.G., Robello, C., 2023. Genome-wide chromatin interaction map for *Trypanosoma cruzi*. *Nat Microbiol* 8, 2103–2114. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01483-y>
- Dietrich, M.A., Nynca, J., Westfalewicz, B., Karol, H., Ciereszko, A., 2011. Identification of calcium-binding proteins in fish seminal plasma. *Fish Physiol Biochem* 37, 447–452. <https://doi.org/10.1007/s10695-010-9445-0>
- Docampo, R., 1990. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-Biological Interactions* 73, 1–27. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(90\)90106-W](https://doi.org/10.1016/0009-2797(90)90106-W)
- Docampo, R., De Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, S.N.J., 2005. Acidocalcisomes ? conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 3, 251–261. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>
- Docampo, R., Huang, G., 2015. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. *Cell Calcium* 57, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.10.015>
- Docampo, R., Jimenez, V., Lander, N., Li, Z.-H., Niyogi, S., 2013. New Insights into Roles of Acidocalcisomes and Contractile Vacuole Complex in Osmoregulation in Protists, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 69–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407695-2.00002-0>

- Docampo, R., Moreno, S.N.J., 2011. Acidocalcisomes. *Cell Calcium* 50, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.012>
- Docampo, R., Moreno, S.N.J., 1996. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitology Today* 12, 61–65. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)80656-9](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)80656-9)
- Docampo, R., Vercesi, A.E., Huang, G., 2014. Mitochondrial calcium transport in trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 196, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.09.001>
- Dos Santos, G.R.R., Rezende Leite, A.C., Lander, N., Chiurillo, M.A., Vercesi, A.E., Docampo, R., 2021. *Trypanosoma cruzi* Letm1 is involved in mitochondrial Ca²⁺ transport, and is essential for replication, differentiation, and host cell invasion. *The FASEB Journal* 35. <https://doi.org/10.1096/fj.202100120RR>
- Eberhard, M., Erne, P., 1994. Calcium and magnesium binding to rat parvalbumin. *European Journal of Biochemistry* 222, 21–26. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18836.x>
- Edidin, M., 2003. The State of Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 257–283. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142439>
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E.A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D.C., Haas, B.J., Tran, A.-N., Wortman, J.R., Alsmark, U.C.M., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J.M., Cerqueira, G.C., Creasy, T., Delcher, A.L., Djikeng, A., Embley, T.M., Hauser, C., Ivens, A.C., Kummerfeld, S.K., Pereira-Leal, J.B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S.L., Shallom, J., Silva, J.C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S.E., Donelson, J.E., Andersson, B., Stuart, K.D., Hall, N., 2005. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* 309, 404–409. <https://doi.org/10.1126/science.1112181>
- Emmer, B.T., Daniels, M.D., Taylor, J.M., Epting, C.L., Engman, D.M., 2010. Calflagin Inhibition Prolongs Host Survival and Suppresses Parasitemia in *Trypanosoma brucei* Infection. *Eukaryot Cell* 9, 934–942. <https://doi.org/10.1128/EC.00086-10>
- Erben, E.D., Nardelli, S.C., De Jesus, T.C.L., Schenkman, S., Tellez-Iñon, M.T., 2013. Trypanosomatid P in1-Type Peptidyl-Prolyl Isomerase Is Cytosolic and Not Essential for Cell Proliferation. *J Eukaryotic Microbiology* 60, 101–105. <https://doi.org/10.1111/jeu.12009>
- Evans, R., O'Neill, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T., Židek, A., Bates, R., Blackwell, S., Yim, J., Ronneberger, O., Bodenstein, S., Zielinski, M., Bridgland, A., Potapenko, A., Cowie, A., Tunyasuvunakool, K., Jain, R., Clancy, E., Kohli, P., Jumper, J., Hassabis, D., 2021. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer (preprint). *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>
- Ferreira, D., Cortez, M., Atayde, V.D., Yoshida, N., 2006. Actin Cytoskeleton-Dependent and -Independent Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Is Mediated by Distinct Parasite Surface Molecules. *Infect Immun* 74, 5522–5528. <https://doi.org/10.1128/IAI.00518-06>
- Ferri, G., Edreira, M.M., 2021. All Roads Lead to Cytosol: *Trypanosoma cruzi* Multi-Strategic Approach to Invasion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 634793. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.634793>
- Ferri, G., Musikant, D., Edreira, M.M., 2023. Host Cell Rap1b mediates cAMP-dependent invasion by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 17, e0011191. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011191>

- Fleming, J.R., Morgan, R.E., Fyfe, P.K., Kelly, S.M., Hunter, W.N., 2013. The architecture of *T. brucei* tubulin-binding cofactor B and implications for function. *The FEBS Journal* 280, 3270–3280. <https://doi.org/10.1111/febs.12308>
- Fraidenraich, D., Peña, C., Isola, E.L., Lammel, E.M., Coso, O., Añel, A.D., Baralle, F., Torres, H.N., Flawia, M.M., 1993a. An alpha D-globin fragment from *Triatoma infestans* hindgut stimulates *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase and promotes metacyclogenesis. *Biol Res* 26, 279–283.
- Fraidenraich, D., Pena, C., Isola, E.L., Lammel, E.M., Coso, O., Anel, A.D., Pongor, S., Baralle, F., Torres, H.N., Flawia, M.M., 1993b. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatoma* hindgut: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 10140–10144. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10140>
- Furuya, T., Kashuba, C., Docampo, R., Moreno, S.N.J., 2000. A Novel Phosphatidylinositol-Phospholipase C of *Trypanosoma cruzi* That Is Lipid Modified and Activated during Trypomastigote to Amastigote Differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 6428–6438. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6428>
- Garcia, E.S., Gonzalez, M.S., Deazambuja, P., Baralle, F.E., Fraidenraich, D., Torres, H.N., Flawia, M.M., 1995. Induction of *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis in the Gut of the Hematophagous Insect Vector, *Rhodnius prolixus*, by Hemoglobin and Peptides Carrying α D-Globin Sequences. *Experimental Parasitology* 81, 255–261. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1116>
- Garcia-Marchan, Y., Sojo, F., Rodriguez, E., Zerpa, N., Malave, C., Galindo-Castro, I., Salerno, M., Benaim, G., 2009. *Trypanosoma cruzi* calmodulin: Cloning, expression and characterization. *Experimental Parasitology* 123, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.08.010>
- Gentry, H.R., Singer, A.U., Betts, L., Yang, C., Ferrara, J.D., Sondek, J., Parise, L.V., 2005. Structural and Biochemical Characterization of CIB1 Delineates a New Family of EF-hand-containing Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 280, 8407–8415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411515200>
- Gifford, J.L., Walsh, M.P., Vogel, H.J., 2007. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal* 405, 199–221. <https://doi.org/10.1042/BJ20070255>
- Gilchrist, C.A., Holm, C.F., Hughes, M.A., Schaenman, J.M., Mann, B.J., Petri, W.A., 2001. Identification and Characterization of an *Entamoeba histolytica* Upstream Regulatory Element 3 Sequence-specific DNA-binding Protein Containing EF-hand Motifs. *Journal of Biological Chemistry* 276, 11838–11843. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007375200>
- Godsel, L.M., 1999. Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism. *The EMBO Journal* 18, 2057–2065. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2057>
- Goldston, A.M., Sharma, A.I., Paul, K.S., Engman, D.M., 2014. Acylation in trypanosomatids: an essential process and potential drug target. *Trends in Parasitology* 30, 350–360. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.05.003>
- Gómez, E.B., Santori, M.I., Laría, S., Engel, J.C., Swindle, J., Eisen, H., Szankasi, P., Téllez-Iñón, M.T., 2001. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. *Molecular and Biochemical Parasitology* 113, 97–108. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00382-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00382-0)
- Gonzales-Perdomo, M., Romero, P., Goldenberg, S., 1988. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Experimental Parasitology* 66, 205–212. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(88\)90092-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(88)90092-6)

- Grabarek, Z., 2011. Insights into modulation of calcium signaling by magnesium in calmodulin, troponin C and related EF-hand proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 913–921. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.017>
- Greenfield, N.J., 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* 1, 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440–3450.
- Hamed, A., Botelho, L., Britto, C., Fragoso, S.P., Umaki, A.C.S., Goldenberg, S., Bottu, G., Salmon, D., 2015. In vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* induced by starvation correlates with a transient adenyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenyl cyclase expression. *Molecular and Biochemical Parasitology* 200, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.04.002>
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R., Michels, P.A., 2003. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 11. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-2-11>
- Hashimoto, M., Doi, M., Kurebayashi, N., Furukawa, K., Hirawake-Mogi, H., Ohmiya, Y., Sakurai, T., Mita, T., Mikoshiba, K., Nara, T., 2016. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor determines intracellular Ca²⁺ concentration in *Trypanosoma cruzi* throughout its life cycle. *FEBS Open Bio* 6, 1178–1185. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12126>
- Hashimoto, M., Enomoto, M., Morales, J., Kurebayashi, N., Sakurai, T., Hashimoto, T., Nara, T., Mikoshiba, K., 2013. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity and virulence of the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Microbiology* 87, 1133–1150. <https://doi.org/10.1111/mmi.12155>
- Hebenstreit, D., Ferreira, F., 2005. Structural changes in calcium-binding allergens: use of circular dichroism to study binding characteristics. *Allergy* 60, 1208–1211. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00907.x>
- Hemmige, V., Tanowitz, H., Sethi, A., 2012. *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. *Int J Dermatology* 51, 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05380.x>
- Hoyer, E., Knöppel, J., Liebmann, M., Steppert, M., Raiwa, M., Herczynski, O., Hanspach, E., Zehner, S., Göttfert, M., Tsushima, S., Fahmy, K., Oertel, J., 2019. Calcium binding to a disordered domain of a type III-secreted protein from a coral pathogen promotes secondary structure formation and catalytic activity. *Sci Rep* 9, 7115. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42898-0>
- Huang, Y., Jiang, Z., Gao, X., Luo, P., Jiang, X., 2021. ARMC Subfamily: Structures, Functions, Evolutions, Interactions, and Diseases. *Front. Mol. Biosci.* 8, 791597. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.791597>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20, 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

- Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1751, 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
- Kielkopf, C.L., Bauer, W., Urbatsch, I.L., 2020. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc* 2020, pdb.prot102269. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- Kimple, M.E., Brill, A.L., Pasker, R.L., 2013. Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *CP Protein Science* 73. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>
- Kolaj-Robin, O., Noor, M.R., O’Kane, S.R., Baymann, F., Soulimane, T., 2013. Atypical Features of *Thermus thermophilus* Succinate:Quinone Reductase. *PLoS ONE* 8, e53559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053559>
- Kollien, A.H., Grospietsch, T., Kleffmann, T., Zerst-Boroffka, I., Schaub, G.A., 2001. Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology* 47, 739–747. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00170-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00170-0)
- Kumar, V., Shoaib, R., Behl, A., Munjal, A., Abid, M., Singh, S., 2022. Prefoldin subunit 6 of *Plasmodium falciparum* binds merozoite surface protein-1. *FEBS Open Bio* 12, 1050–1060. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13022>
- Kutyshenko, V.P., Mikoulinskaia, G.V., Chernyshov, S.V., Yegorov, A.Y., Prokhorov, D.A., Uversky, V.N., 2019. Effect of C-terminal His-tag and purification routine on the activity and structure of the metalloenzyme, l-alanyl-d-glutamate peptidase of the bacteriophage T5. *International Journal of Biological Macromolecules* 124, 810–818. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.219>
- Lai, S., Devenish, R.J., 2012. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. *Cells* 1, 396–408. <https://doi.org/10.3390/cells1030396>
- Lammel, E.M., Barbieri, M.A., Wilkowsky, S.E., Bertini, F., Isola, E.L.D., 1996. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of Intracellular Calcium in Multiplication and Differentiation. *Experimental Parasitology* 83, 240–249. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0070>
- Lander, N., Chiurillo, M.A., Bertolini, M.S., Storey, M., Vercesi, A.E., Docampo, R., 2018. Calcium-sensitive pyruvate dehydrogenase phosphatase is required for energy metabolism, growth, differentiation, and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 293, 17402–17417. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004498>
- Lander, N., Chiurillo, M.A., Docampo, R., 2021. Signaling pathways involved in environmental sensing in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* 115, 819–828. <https://doi.org/10.1111/mmi.14621>
- Leandro De Jesus, T.C., Calderano, S.G., Vitorino, F.N.D.L., Llanos, R.P., Lopes, M.D.C., De Araújo, C.B., Thiemann, O.H., Reis, M.D.S., Elias, M.C., Chagas Da Cunha, J.P., 2017. Quantitative Proteomic Analysis of Replicative and Nonreplicative Forms Reveals Important Insights into Chromatin Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Cellular Proteomics* 16, 23–38. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.061200>
- Lemoine, F., Domelevo Entfellner, J.-B., Wilkinson, E., Correia, D., Dávila Felipe, M., De Oliveira, T., Gascuel, O., 2018. Renewing Felsenstein’s phylogenetic bootstrap in the era of big data. *Nature* 556, 452–456. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0043-0>
- Li, J., Jia, Z., Zhou, W., Wei, Q., 2009. Calcineurin regulatory subunit B is a unique calcium sensor that regulates calcineurin in both calcium-dependent and calcium-independent manner. *Proteins* 77, 612–623. <https://doi.org/10.1002/prot.22474>
- Liang, J., Xia, L., Oyang, L., Lin, J., Tan, S., Yi, P., Han, Y., Luo, X., Wang, H., Tang, L., Pan, Q., Tian, Y., Rao, S., Su, M., Shi, Y., Cao, D., Zhou, Y., Liao, Q., 2020. The functions and mechanisms of

prefoldin complex and prefoldin-subunits. *Cell Biosci* 10, 87. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00446-8>

Libisch, M.G., Rego, N., Robello, C., 2021. Transcriptional Studies on *Trypanosoma cruzi* – Host Cell Interactions: A Complex Puzzle of Variables. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 692134. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.692134>

Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., Sandri, T.L., 2019. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Health* 7, 166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>

Linder, M.E., Deschenes, R.J., 2007. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 74–84. <https://doi.org/10.1038/nrm2084>

Linder, M.E., Jennings, B.C., 2013. Mechanism and function of DHHC S-acyltransferases. *Biochemical Society Transactions* 41, 29–34. <https://doi.org/10.1042/BST20120328>

Lu, H.-G., Zhong, L., Chang, K.-P., Docampo, R., 1997. Intracellular Ca²⁺ Pool Content and Signaling and Expression of a Calcium Pump Are Linked to Virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* Amastigotes. *Journal of Biological Chemistry* 272, 9464–9473. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9464>

Lukeš, J., Lys Guilbride, D., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., Englund, P.T., 2002. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryot Cell* 1, 495–502. <https://doi.org/10.1128/EC.1.4.495-502.2002>

Machado, F.S., Dutra, W.O., Esper, L., Gollob, K.J., Teixeira, M.M., Factor, S.M., Weiss, L.M., Nagajyothi, F., Tanowitz, H.B., Garg, N.J., 2012. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol* 34, 753–770. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>

Maeda, F.Y., Cortez, C., Yoshida, N., 2012. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Front. Immun.* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00361>

Maganto-Garcia, E., Punzon, C., Terhorst, C., Fresno, M., 2008. Rab5 Activation by Toll-Like Receptor 2 is Required for *Trypanosoma cruzi* Internalization and Replication in Macrophages. *Traffic* 9, 1299–1315. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00760.x>

Manchola, N.C., Rapado, L.N., Barisón, M.J., Silber, A.M., 2016. Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryotic Microbiology* 63, 299–308. <https://doi.org/10.1111/jeu.12278>

Manchola Varón, N.C., Dos Santos, G.R.R.M., Colli, W., Alves, M.J.M., 2021. Interaction With the Extracellular Matrix Triggers Calcium Signaling in *Trypanosoma cruzi* Prior to Cell Invasion. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 731372. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.731372>

Mandacaru, S.C., Queiroz, R.M.L., Alborghetti, M.R., De Oliveira, L.S., De Lima, C.M.R., Bastos, I.M.D., Santana, J.M., Roepstorff, P., Ricart, C.A.O., Charneau, S., 2019. Exoproteome profiling of *Trypanosoma cruzi* during amastigogenesis early stages. *PLoS ONE* 14, e0225386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225386>

Manque, P.M., Neira, I., Atayde, V.D., Cordero, E., Ferreira, A.T., Da Silveira, J.F., Ramirez, M., Yoshida, N., 2003. Cell Adhesion and Ca²⁺ Signaling Activity in Stably Transfected *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Expressing the Metacyclic Stage-Specific Surface Molecule gp82. *Infect Immun* 71, 1561–1565. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1561-1565.2003>

Marchini, F.K., de Godoy, L.M.F., Rampazzo, R.C.P., Pavoni, D.P., Probst, C.M., Gnad, F., Mann, M., Krieger, M.A., 2011. Profiling the *Trypanosoma cruzi* Phosphoproteome. *PLoS ONE* 6, e25381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025381>

- Maric, D., Olson, C.L., Xu, X., Ames, J.B., Engman, D.M., 2015. Calcium-dependent membrane association of a flagellar calcium sensor does not require calcium binding. *Molecular and Biochemical Parasitology* 201, 72–75. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.06.003>
- Martin, S.R., Schilstra, M.J., 2008. Circular Dichroism and Its Application to the Study of Biomolecules, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 263–293. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84010-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84010-6)
- Martínez, I., Noguera, B., Martínez-Hernández, F., Espinoza, B., 2013. Microsatellite and Mini-Exon Analysis of Mexican Human DTU I *Trypanosoma cruzi* Strains and Their Susceptibility to Nifurtimox and Benznidazole. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 13, 181–187. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1072>
- Martins, N.O., Souza, R.T.D., Cordero, E.M., Maldonado, D.C., Cortez, C., Marini, M.M., Ferreira, E.R., Bayer-Santos, E., Almeida, I.C.D., Yoshida, N., Silveira, J.F.D., 2015. Molecular Characterization of a Novel Family of *Trypanosoma cruzi* Surface Membrane Proteins (TcSMP) Involved in Mammalian Host Cell Invasion. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0004216. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004216>
- Mason, A.B., He, Q.-Y., Halbrooks, P.J., Everse, S.J., Gumerov, D.R., Kaltashov, I.A., Smith, V.C., Hewitt, J., MacGillivray, R.T.A., 2002. Differential Effect of a His Tag at the N- and C-Termini: Functional Studies with Recombinant Human Serum Transferrin. *Biochemistry* 41, 9448–9454. <https://doi.org/10.1021/bi025927l>
- Mazza, S., 1949. La enfermedad de Chagas en la Republica Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 47, 273–302. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761949000100011>
- Medina-Rincón, G.J., Gallo-Bernal, S., Jiménez, P.A., Cruz-Saavedra, L., Ramírez, J.D., Rodríguez, M.J., Medina-Mur, R., Díaz-Nassif, G., Valderrama-Achury, M.D., Medina, H.M., 2021. Molecular and Clinical Aspects of Chronic Manifestations in Chagas Disease: A State-of-the-Art Review. *Pathogens* 10, 1493. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111493>
- Michels, P.A.M., Gualdrón-López, M., 2022. Biogenesis and metabolic homeostasis of trypanosomatid glycosomes: New insights and new questions. *J Eukaryotic Microbiology* 69, e12897. <https://doi.org/10.1111/jeu.12897>
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., Steinegger, M., 2022. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* 19, 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Mitra, P., Gupta, E.D., Sahar, T., Pandey, A.K., Dangi, P., Reddy, K.S., Chauhan, V.S., Gaur, D., 2016. Evidence for the Nucleo-Apical Shuttling of a Beta-Catenin Like *Plasmodium falciparum* Armadillo Repeat Containing Protein. *PLoS ONE* 11, e0148446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148446>
- Moreno, S.N., Silva, J., Vercesi, A.E., Docampo, R., 1994. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *The Journal of experimental medicine* 180, 1535–1540. <https://doi.org/10.1084/jem.180.4.1535>
- Mueller, C., Samoo, A., Hammoudi, P.-M., Klages, N., Kallio, J.P., Kursula, I., Soldati-Favre, D., 2016. Structural and functional dissection of *Toxoplasma gondii* armadillo repeats only protein (TgARO). *Journal of Cell Science* jcs.177386. <https://doi.org/10.1242/jcs.177386>
- Murta, S.M.F., Gazzinelli, R.T., Brener, Z., Romanha, A.J., 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Molecular and Biochemical Parasitology* 93, 203–214. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00037-1)

- Murta, S.M.F., Romanha, A.J., 1998. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 116, 165–171. <https://doi.org/10.1017/S0031182097002084>
- Nagae, M., Nozawa, A., Koizumi, N., Sano, H., Hashimoto, H., Sato, M., Shimizu, T., 2003. The Crystal Structure of the Novel Calcium-binding Protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 42240–42246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303630200>
- Ning, Z., Hawley, B., Chiang, C.-K., Seebun, D., Figeys, D., 2014. Detecting Protein–Protein Interactions/Complex Components Using Mass Spectrometry Coupled Techniques, in: Miyamoto-Sato, E., Ohashi, H., Sasaki, H., Nishikawa, J., Yanagawa, H. (Eds.), *Transcription Factor Regulatory Networks, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0805-9_1
- Nogueira, N., Cohn, Z., 1976. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *The Journal of experimental medicine* 143, 1402–1420. <https://doi.org/10.1084/jem.143.6.1402>
- Nogueira, N.P.D.A., Souza, C.F.D., Saraiva, F.M.D.S., Sultano, P.E., Dalmau, S.R., Bruno, R.E., De Lima Sales Gonçalves, R., Laranja, G.A.T., Leal, L.H.M., Coelho, M.G.P., Masuda, C.A., Oliveira, M.F., Paes, M.C., 2011. Heme-Induced ROS in *Trypanosoma Cruzi* Activates CaMKII-Like That Triggers Epimastigote Proliferation. One Helpful Effect of ROS. *PLoS ONE* 6, e25935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025935>
- Nogueira, P.M., Ribeiro, K., Silveira, A.C.O., Campos, J.H., Martins-Filho, O.A., Bela, S.R., Campos, M.A., Pessoa, N.L., Colli, W., Alves, M.J.M., Soares, R.P., Torrecilhas, A.C., 2015. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J of Extracellular Vesicle* 4, 28734. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734>
- Ogunrinde, A., Munro, K., Davidson, A., Ubaid, M., Snedden, W.A., 2017. *Arabidopsis* Calmodulin-Like Proteins, CML15 and CML16 Possess Biochemical Properties Distinct from Calmodulin and Show Non-overlapping Tissue Expression Patterns. *Front. Plant Sci.* 8, 2175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02175>
- Ohtaki, A., 2010. Structure and function of archaeal prefoldin, a co-chaperone of group II chaperonin. *Front Biosci* 15, 708. <https://doi.org/10.2741/3641>
- Okuda, K., Esteva, M., Segura, E.L., Bijovsky, A.T., 1999. The Cytostome of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Is Associated with the Flagellar Complex. *Experimental Parasitology* 92, 223–231. <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4419>
- Okura, M., Fang, J., Salto, M.L., Singer, R.S., Docampo, R., Moreno, S.N.J., 2005. A Lipid-modified Phosphoinositide-specific Phospholipase C (TcPI-PLC) Is Involved in Differentiation of Trypomastigotes to Amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 16235–16243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414535200>
- Paiva, C.N., Souto-Padron, T., Costa, D.A., Gattass, C.R., 1998. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. *Parasitology* 117, 483–490. <https://doi.org/10.1017/S0031182098003266>
- Patel, S., Docampo, R., 2010. Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends in Cell Biology* 20, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.02.003>
- Peifer, M., Berg, S., Reynolds, A.B., 1994. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76, 789–791. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90353-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90353-0)

- Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2018. Chagas disease. *The Lancet* 391, 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Queiroz, R.M.L., Charneau, S., Bastos, I.M.D., Santana, J.M., Sousa, M.V., Roepstorff, P., Ricart, C.A.O., 2014. Cell Surface Proteome Analysis of Human-Hosted *Trypanosoma cruzi* Life Stages. *J. Proteome Res.* 13, 3530–3541. <https://doi.org/10.1021/pr401120y>
- Ramakrishnan, S., Docampo, R., 2018. Membrane Proteins in Trypanosomatids Involved in Ca²⁺ Homeostasis and Signaling. *Genes* 9, 304. <https://doi.org/10.3390/genes9060304>
- Ramírez, J.L., 2023. The Elusive *Trypanosoma cruzi* Disperse Gene Protein Family (DGF-1). *Pathogens* 12, 292. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020292>
- Rangel-Aldao, R., Triana, F., Comach, G., Abate, T., Fernández, V., McMahon-Pratt, D., 1988. Intracellular signaling transduction in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*: role of cAMP. *Arch Biol Med Exp* 21, 403–408.
- Ranjbar, B., Gill, P., 2009. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. *Chem Biol Drug Des* 74, 101–120. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00847.x>
- Rassi, A., Rassi, A., Marcondes De Rezende, J., 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* 26, 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rassi, A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *The Lancet* 375, 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rebrik, T.I., Botchkina, I., Arshavsky, V.Y., Craft, C.M., Korenbrot, J.I., 2012. CNG-Modulin: A Novel Ca-Dependent Modulator of Ligand Sensitivity in Cone Photoreceptor cGMP-Gated Ion Channels. *J. Neurosci.* 32, 3142–3153. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5518-11.2012>
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., Yao, X., 2008. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Engineering Design and Selection* 21, 639–644. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn039>
- Rey-Cibati, A., Valladares-Delgado, M., Benaim, G., 2020. Determination of Intracellular Ca²⁺ Concentration in the Human Pathogens Trypanosomatids *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi* by the Use of the Fluorescent Ca²⁺ Indicator Fura-2. *BIO-PROTOCOL* 10. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3766>
- Ribeiro, K.S., Vasconcellos, C.I., Soares, R.P., Mendes, M.T., Ellis, C.C., Aguilera-Flores, M., De Almeida, I.C., Schenkman, S., Iwai, L.K., Torrecilhas, A.C., 2018. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *J of Extracellular Vesicle* 7, 1463779. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1463779>
- Rodrigues, J.P.F., Souza Onofre, T., Barbosa, B.C., Ferreira, É.R., Bonfim-Melo, A., Yoshida, N., 2019. Host cell protein LAMP-2 is the receptor for *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 that mediates invasion. *Cellular Microbiology* 21, e13003. <https://doi.org/10.1111/cmi.13003>
- Rodriguez-Duran, J., Pinto-Martinez, A., Castillo, C., Benaim, G., 2019. Identification and electrophysiological properties of a sphingosine-dependent plasma membrane Ca²⁺ channel in *Trypanosoma cruzi*. *The FEBS Journal* 286, 3909–3925. <https://doi.org/10.1111/febs.14947>
- Rodríguez, A., Martínez, I., Chung, A., Berlot, C.H., Andrews, N.W., 1999. cAMP Regulates Ca²⁺-dependent Exocytosis of Lysosomes and Lysosome-mediated Cell Invasion by Trypanosomes. *Journal of Biological Chemistry* 274, 16754–16759. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16754>

- Rohloff, P., Montalvetti, A., Docampo, R., 2004. Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex Are Involved in Osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 52270–52281. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410372200>
- Rohloff, P., Rodrigues, C.O., Docampo, R., 2003. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126, 219–230. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00277-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00277-3)
- Romano, P.S., Arboit, M.A., Vázquez, C.L., Colombo, M.I., 2009. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy* 5, 6–18. <https://doi.org/10.4161/auto.5.1.7160>
- Roth, A.F., Feng, Y., Chen, L., Davis, N.G., 2002. The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *The Journal of Cell Biology* 159, 23–28. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206120>
- Ruiz, C.R., Favoreto, S., Dorta, L.M., Oshiro, E.M.M., Ferreira, T.A., Manque, M.P., Yoshida, N., 1998a. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochemical Journal* 330, 505–511. <https://doi.org/10.1042/bj3300505>
- Ruiz, C.R., Favoreto, S., Dorta, L.M., Oshiro, E.M.M., Ferreira, T.A., Manque, M.P., Yoshida, N., 1998b. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochemical Journal* 330, 505–511. <https://doi.org/10.1042/bj3300505>
- Salassa, B.N., Romano, P.S., 2019. Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence* 10, 460–469. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1543517>
- Sánchez-Valdéz, F.J., Pérez Brandán, C., Ramírez, G., Uncos, A.D., Zago, M.P., Cimino, R.O., Cardozo, R.M., Marco, J.D., Ferreira, A., Basombrío, M.Á., 2014. A Monoallelic Deletion of the TcCRT Gene Increases the Attenuation of a Cultured *Trypanosoma cruzi* Strain, Protecting against an In Vivo Virulent Challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2696. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002696>
- Sant'Anna, C., De Souza, W., Cunha-e-Silva, N., 2004. Biogenesis of the Reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal* 10, 637–646. <https://doi.org/10.1017/S1431927604040863>
- Santos Júnior, A.D.C.M.D., Melo, R.M., Ferreira, B.V.G., Pontes, A.H., Lima, C.M.R.D., Fontes, W., Sousa, M.V.D., Lima, B.D.D., Ricart, C.A.O., 2021. Quantitative proteomics and phosphoproteomics of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1869, 140619. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140619>
- Sastry, M., Ketchum, R.R., Crescenzi, O., Weber, C., Lubinski, M.J., Hidaka, H., Chazin, W.J., 1998. The three-dimensional structure of Ca²⁺-bound calyculin: implications for Ca²⁺-signal transduction by S100 proteins. *Structure* 6, 223–231. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00023-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00023-9)
- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M.M.A., Lima, A.P.C.A., Morrot, A., Juliano, L., Müller-Esterl, W., 2000. Host Cell Invasion by *TRYPANOSOMA CRUZI* Is Potentiated by Activation of Bradykinin B2 Receptors. *The Journal of Experimental Medicine* 192, 1289–1300. <https://doi.org/10.1084/jem.192.9.1289>
- Schmidt, J., Kleffmann, T., Schaub, G.A., 1998. Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans*. *Parasitology Research* 84, 527–536. <https://doi.org/10.1007/s004360050443>

- Schwaller, B., 2020. Cytosolic Ca²⁺ Buffers Are Inherently Ca²⁺ Signal Modulators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12, a035543. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035543>
- Shanmugasundram, A., Starns, D., Böhme, U., Amos, B., Wilkinson, P.A., Harb, O.S., Warrenfeltz, S., Kissinger, J.C., McDowell, M.A., Roos, D.S., Crouch, K., Jones, A.R., 2023. TriTrypDB: An integrated functional genomics resource for kinetoplastida. *PLoS Negl Trop Dis* 17, e0011058. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011058>
- Shenoy-Scaria, A.M., Gauen, L.K.T., Kwong, J., Shaw, A.S., Lublin, D.M., 1993. Palmitoylation of an Amino-Terminal Cysteine Motif of Protein Tyrosine Kinases p56^{lck} and p59^{fyn} Mediates Interaction With Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 13, 6385–6392. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6385-6392.1993>
- Sia, S.K., Li, M.X., Spyropoulos, L., Gagné, S.M., Liu, W., Putkey, J.A., Sykes, B.D., 1997. Structure of Cardiac Muscle Troponin C Unexpectedly Reveals a Closed Regulatory Domain. *Journal of Biological Chemistry* 272, 18216–18221. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18216>
- Silber, A.M., Pereira, C.A., 2012. Assignment of Putative Functions to Membrane “Hypothetical Proteins” from the *Trypanosoma cruzi* Genome. *J Membrane Biol* 245, 125–129. <https://doi.org/10.1007/s00232-012-9420-z>
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Sosa-Estani, S., Segura, E.L., 2015. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 289–298. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140408>
- Souza, W., 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *CPD* 8, 269–285. <https://doi.org/10.2174/1381612023396276>
- Souza, W.D., 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 89–100. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900014>
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Sullivan, J.J., 1982. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in vitro: a simplified procedure. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 76, 300–303. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(82\)90173-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(82)90173-0)
- Tahmaz, I., Shahmoradi Ghahe, S., Topf, U., 2022. Prefoldin Function in Cellular Protein Homeostasis and Human Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 816214. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.816214>
- Tang, N., Skibsted, L.H., 2016. Calcium Binding to Amino Acids and Small Glycine Peptides in Aqueous Solution: Toward Peptide Design for Better Calcium Bioavailability. *J. Agric. Food Chem.* 64, 4376–4389. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01534>
- Tanowitz, H.B., Kirchhoff, L.V., Simon, D., Morris, S.A., Weiss, L.M., Wittner, M., 1992. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev* 5, 400–419. <https://doi.org/10.1128/CMR.5.4.400>
- Tatsumi, R., Shimada, K., Hattori, A., 1997. Fluorescence Detection of Calcium-Binding Proteins with Quinoline Ca-Indicator Quin2. *Analytical Biochemistry* 254, 126–131. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2369>
- Teixeira, A.R., Nascimento, R.J., Sturm, N.R., 2006. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 463–491. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000500001>

- Teixeira, D.E., Benchimol, M., Crepaldi, P.H., De Souza, W., 2012. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1749. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>
- Téllez-iñón, M.T., Ulloa, R.M., Torruella, M., Torres, H.N., 1985. Calmodulin and Ca²⁺-dependent cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 17, 143–153. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90013-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90013-1)
- Urbina, J., 2002. Chemotherapy of Chagas Disease. *CPD* 8, 287–295. <https://doi.org/10.2174/1381612023396177>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., Velankar, S., 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* 50, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Vazquez, M.P., Levin, M.J., 1999. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239, 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00386-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00386-8)
- Vela, A., Coral-Almeida, M., Sereno, D., Costales, J.A., Barnabé, C., Brenière, S.F., 2021. In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 15, e0009269. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009269>
- Velásquez-Ortiz, N., Herrera, G., Hernández, C., Muñoz, M., Ramírez, J.D., 2022. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. *Sci Data* 9, 360. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01452-w>
- Vidal, J.C., Alcantara, C.D.L., De Souza, W., Cunha-e-Silva, N.L., 2016. Loss of the cytostome-cytopharynx and endocytic ability are late events in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Journal of Structural Biology* 196, 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.07.018>
- Vidal, J.C., Souza, W.D., 2017. Morphological and Functional Aspects of Cytoskeleton of Trypanosomatids, in: Jimenez-Lopez, J.C. (Ed.), *Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66859>
- Vologzhannikova, A.A., Khorn, P.A., Kazakov, A.S., Permyakov, E.A., Uversky, V.N., Permyakov, S.E., 2019. Effects of his-tags on physical properties of parvalbumins. *Cell Calcium* 77, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.11.006>
- Wan, J., Roth, A.F., Bailey, A.O., Davis, N.G., 2007. Palmitoylated proteins: purification and identification. *Nat Protoc* 2, 1573–1584. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.225>
- Wilkowsky, S.E., Barbieri, M.A., Stahl, P., Isola, E.L.D., 2001. *Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B Activation Is Associated with Parasite Invasion. *Experimental Cell Research* 264, 211–218. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5123>
- Wingard, J.N., Chan, J., Bosanac, I., Haeseleer, F., Palczewski, K., Ikura, M., Ames, J.B., 2005. Structural Analysis of Mg²⁺ and Ca²⁺ Binding to CaBP1, a Neuron-specific Regulator of Calcium Channels. *Journal of Biological Chemistry* 280, 37461–37470. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508541200>
- Wingard, J.N., Ladner, J., Vanarotti, M., Fisher, A.J., Robinson, H., Buchanan, K.T., Engman, D.M., Ames, J.B., 2008. Structural Insights into Membrane Targeting by the Flagellar Calcium-binding

Protein (FCaBP), a Myristoylated and Palmitoylated Calcium Sensor in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 23388–23396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803178200>

Wingfield, P.T., 2015. Overview of the Purification of Recombinant Proteins. *CP Protein Science* 80. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>

Wright, N.T., Varney, K.M., Ellis, K.C., Markowitz, J., Gitti, R.K., Zimmer, D.B., Weber, D.J., 2005. The Three-dimensional Solution Structure of Ca²⁺-bound S100A1 as Determined by NMR Spectroscopy. *Journal of Molecular Biology* 353, 410–426. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.027>

Yakubu, M.A., Majumder, S., Kierszenbaum, F., 1994. Changes in *Trypanosoma cruzi* infectivity by treatments that affect calcium ion levels. *Molecular and Biochemical Parasitology* 66, 119–125. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90042-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90042-6)

Yee, A., Chang, X., Pineda-Lucena, A., Wu, B., Semesi, A., Le, B., Ramelot, T., Lee, G.M., Bhattacharyya, S., Gutierrez, P., Denisov, A., Lee, C.-H., Cort, J.R., Kozlov, G., Liao, J., Finak, G., Chen, L., Wishart, D., Lee, W., McIntosh, L.P., Gehring, K., Kennedy, M.A., Edwards, A.M., Arrowsmith, C.H., 2002. An NMR approach to structural proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1825–1830. <https://doi.org/10.1073/pnas.042684599>

Yee, A.A., Semesi, A., Garcia, M., Arrowsmith, C.H., 2014. Screening Proteins for NMR Suitability, in: Anderson, W.F. (Ed.), *Structural Genomics and Drug Discovery, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 169–178. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0354-2_13

Yoshida, N., Cortez, M., 2008. *Trypanosoma cruzi*: Parasite and Host Cell Signaling during the Invasion Process, in: Burleigh, B.A., Soldati-Favre, D. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion, Subcellular Biochemistry*. Springer New York, New York, NY, pp. 82–91. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_6

Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2011. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium* 50, 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.03.003>

Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A., Machado, C., Miles, M., Romanha, A., Sturm, N., Tibayrenc, M., Schijman, A., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>