



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tráfico vesicular en Tripanosomátidos: evaluación funcional de la proteína Vps32

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

Bioq. Nadia Maricel Barrera

Director de Tesis: Dr. Guillermo D. Alonso

Directora Adjunta: Dra. Alejandra C. Schoijet

Consejero de Estudios: Dr. Alejandro Nadra

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería genética y

Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI).

Buenos Aires, Argentina. 2025

Tráfico vesicular en Tripanosomátidos: evaluación funcional de la proteína Vps32

Trypanosoma brucei y *Trypanosoma cruzi* presentan un ciclo de vida digenético, caracterizado por la alternancia entre estadios morfológica y funcionalmente diferenciados en el vector insecto y el hospedador mamífero. Estas transiciones se llevan a cabo gracias a que estos organismos son hábiles en implementar diversos mecanismos moleculares orientados a la adaptación ambiental y al restablecimiento de la homeostasis celular, procesos fundamentales para la progresión del ciclo vital y la persistencia de la infección. Entre estos procesos, es destacable el rol esencial del tráfico vesicular tanto intracelular como extracelular. Durante la endocitosis, los endosomas tardíos (LE) compuestos por vesículas intraluminales (ILV), conocidos como cuerpos multivesiculares (MVB), desempeñan un papel en el reconocimiento y transporte de proteínas ubiquitinadas desde la superficie celular hacia el lisosoma para su degradación. Estos MVB están compuestos principalmente por proteínas que conforman el Complejo de Clasificación Endosomal Requerido para el Transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés), el cual es clasificado en cuatro subcomplejos (0–III), siendo el ESCRT-III el más conservado entre los taxones eucariotas. Vps32, la proteína más abundante de ESCRT-III, se caracteriza por cumplir un papel relevante en la biogénesis y tráfico vesicular, como así también en la citoquinesis de *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*. Asimismo, en *Trypanosoma brucei* se han identificado ortólogos de la maquinaria ESCRT que participan en una amplia variedad de eventos de remodelación de membrana y en la endocitosis. En el presente estudio, detectamos el ortólogo de Vps32 en *Trypanosoma brucei*, nombrado TbVps32, y el ortólogo en *Trypanosoma cruzi*, nombrado TcVps32. En *T. brucei*, TbVps32 se localizó en asociación con compartimentos endocíticos de la vía hacia el lisosoma; asimismo, TcVps32 de *T. cruzi* mostró un patrón de distribución subcelular semejante, sugiriendo la posible localización en compartimentos equivalentes. Las líneas celulares que sobreexpresaban TbVps32 de manera inducible y las líneas celulares en las cuales TbVps32 había sido silenciada por RNAi, mostraron alteración del crecimiento celular y la aparición de fenotipos celulares anormales en ambos contextos. A través de ambas estrategias, detectamos que TbVps32 podría ser participe del transporte vesicular hacia el lisosoma y de la progresión del ciclo celular. Simultáneamente, la

sobreexpresión constitutiva de TcVps32 de *T. cruzi* alteró la capacidad proliferativa los cultivos y promovió el desarrollo de fenotipos atípicos. Adicionalmente, ante la delección de hélices específicas de la región C- terminal (CTR) de TcVps32, se evidenció el cambio de localización de la proteína y la afectación proliferativa más pronunciada de los cultivos.

En base a los análisis *in silico*, las estructuras de TbVps32 y TcVps32 revelaron que la región N-terminal (NTR) se encuentra conservada. En cuanto a la región C-terminal (CTR), nuestros resultados nos permiten hipotetizar que esta región podría desempeñar un papel regulatorio de la actividad de Vps32, tal como ha sido reportado en otros organismos.

En suma, proponemos que TbVps32 y TcVps32 forman parte de la vía endocítica y son esenciales para la supervivencia de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*.

Palabras clave: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, ESCRT, Vps32, tráfico vesicular, endocitosis

Vesicular trafficking in Tripanosomatids: functional analysis of Vps32 protein

Trypanosoma brucei and *Trypanosoma cruzi* alternate between the multiple stages in the insect vector and mammal host, requiring processes for adapting and restoring homeostasis during life cycle progression and infection. These transitions are enabled by the organisms' ability to implement diverse molecular mechanisms aimed at environmental adaptation and the reestablishment of cellular homeostasis—processes that are fundamental for life cycle progression and infection persistence. Among these processes, the essential role of both intracellular and extracellular vesicular trafficking is particularly noteworthy. During endocytosis, late endosomes (LE) composed by intraluminal vesicles (ILV), referred as the multivesicular bodies (MVB), play a role in transporting ubiquitinated cell surface proteins to the lysosome for degradation. These MVB are mainly composed of proteins members of The Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT), which is classified into four subcomplexes (0-III) being ESCRT- III the most conserved among eukaryotic taxa. Vps32, the most abundant protein of ESCRT- III, plays an important role in vesicle biogenesis and vesicular trafficking as well as cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Homo sapiens*. Orthologs of the ESCRT machinery have also been identified in *Trypanosoma brucei*, where they participate in a wide range of membrane remodeling events and endocytosis. In the present study, we have detected the Vps32 orthologue in *Trypanosoma brucei*, named TbVps32, and Vps32 orthologue in *Trypanosoma cruzi* named TcVps32.

In *T. brucei*, TbVps32 was localized in association with endocytic compartments; similarly, in *T. cruzi*, TcVps32 showed a comparable subcellular distribution pattern that could be related to the same compartments. The knockdown cell lines of TbVps32 by interference RNA and as well as HA-TbVps32 inducible over-expression cell lines, exhibited impaired cell growth and abnormal cellular phenotypes. Through both experimental strategies, we suggest that TbVps32 may play a role in vesicular transport to the lysosome and cell cycle progression.

Also, the constitutive overexpression of TcVps32 resulted in the inhibition of cell

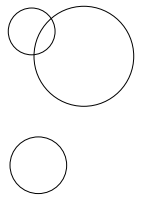
growth and promoted the development of atypical phenotypes. Removing specific C-terminal helices of TcVps32 greatly changed the localization of protein and affected cell lines proliferation.

Based on in-silico analysis, the structure of TbVps32 and TcVps32 determined that N-terminal region (NTR) is conserved. Regarding the C-terminal region (CTR), our results let us hypothesize that this short region may play a general role in regulating the activity of this protein.

Overall, we propose that TbVps32 and TcVps32 are both part of endocytic pathway and are essential for *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* survival.

Key words: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, ESCRT, Vps32, vesicular trafficking, endocytosis.

*A mi familia de origen, a mi nueva familia y a todos los que
conspiraron a mi favor a lo largo de este camino, haciendo posible
que hoy esté presenteando mi Tesis doctoral*



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires por haberme brindado la posibilidad de estudiar Bioquímica, profesión que elegí cuando tenía 13 años.

Al CONICET por haberme otorgado la beca Doctoral y permitirme realizar este trabajo.

A mi director, el Dr. Guillermo Alonso, por haberme permitido ser parte del Laboratorio 209 y del INGEBI, por haberme ayudado a crecer a lo largo de estos años de manera académica y también a nivel humano, por tenerme paciencia (mucho), por traducir mis divagues mentales y por ayudarme a sumergirme en las aguas de la ciencia y la búsqueda de la “verdad”. Gracias.

A mi directora adjunta, Dra. Alejandra Schoijet, por la comprensión, la sinceridad, el compañerismo y apoyo constante. Por creer en mí y transmitirme calma y la certeza de que todo se puede afrontar con paciencia y con tranquilidad. Una persona admirable como mujer y científica.

A mis compañeros del Lab 209: Tami, Lau, Salo, Pato, Mile... por el compañerismo, la solidaridad, la escucha y el apoyo en los buenos y malos momentos. Los voy a recordar siempre.

A la Dra. Wanda Valsecchi por su apoyo absoluto, su generosidad, su dedicación, sus palabras y su sinceridad para conmigo. Una genia de las genias, que fue totalmente bondadosa con su conocimiento. Eternamente agradecida por haberte conocido.

A la UNSAM por abrirme las puertas y, en especial a la Dra. Paula Iribarren y Dra. Vanina Álvarez, por el compromiso y su generosidad.

A Alejandro Nadra por su compromiso y su escucha. Sin dudas, un gran tutor.

A mis padres y a mi hermano por brindarme todo para que pueda estudiar, por su amor, por el empuje, por el apoyo todos los días para que siga adelante y por haber estado presentes siempre. Gracias.

A mis amigas que han sido un apoyo incondicional a lo largo de estos años, por su amor y su confianza...porque hablar del “*Trypanosoma cruzi*” con ustedes, fue más divertido.

A Axel por su amor incondicional, por hacer de mis días de escritura los más hogareños y amorosos. Por la paciencia, la comprensión, la escucha constante y por ayudarme hasta en los mínimos detalles. Gracias.

A todos los investigadores que he conocido a lo largo de este camino recorrido, los cuales me han hecho descubrir un nuevo mundo en el cual la duda y las preguntas siempre son válidas y celebradas.

A Yanina C. y a Alejandra T. por acompañarme en este camino, por su apoyo y por brindarme herramientas para superarme y creer en mí.

MUCHAS GRACIAS A TODOS 

ABREVIATURAS

ARN: ácido ribonucleico	RNAi: ARN de interferencia
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool	SFB: suero fetal bovino
BSA: seroalbúmina bovina	SL: Splice Leader, miniexón
COP: coatómeros, Coat complex protein	STAM: Signal Transducing Adaptor Molecule
CPC: Chromosomal Passenger Complex	Tet: tetraciclina
CTR: región C-terminal	Vps: Vacuolar protein Sorting
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	VSG: Variant Surface Glycoprotein, glicoproteína variable de superficie
DNA: ácido desoxirribonucleico	
DQ- BSA: Dye Quenched-Bovine Serum Albumin	
ER: retículo endoplásmico	
ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport	
EV: vesículas extracelulares	
FAZ: Flagellum Attachment Zone	
FP: Flagellar Pocket, bolsillo flagelar	
GPI: ancla glicosilfosfatidilinositol	
HA: hemaglutinina	
Hrs: Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	
HU: Hidroxiurea	
ICB: intercellular bridge, puente intercelular	
IFT: Intraflagellar transport, transporte intraflagelar	
ILV: intralumenal vesicles, vesículas intraluminales	
IP: Ioduro de Propidio	
Kb: kilobases	
kDNA: ADN mitocondrial	
LB: medio Luria- Bertani	
Merge: superposición	
MVB: Multivesicular bodies, cuerpos multivesiculares	
NTR: región N-terminal	
pb: pares de bases	
PDB: Protein Data Bank	
pI: punto isoeléctrico	
PI3P: fosfatidilinositol 3-fosfato	
PRF: Paraflagellar Rod	
RMSF: Root-Mean-Square Fluctuation	

ÍNDICE

Introducción.....	1
1.Enfermedad de Chagas.....	3
2.Enfermedad del sueño.....	4
3.Los tripanosomátidos.....	6
3.1Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
3.2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i>	8
4. Tráfico vesicular en eucariotas.....	10
4.1 Endocitosis: generalidades.....	12
4.1.1 Vesículas recubiertas de clatrina.....	17
4.1.2 Vesículas intraluminales (ILVs) y cuerpos Multivesiculares (MVB).....	18
4.1.2.1 ESCRT: aspectos generales.....	19
ESCRT-0.....	23
ESCRT-I.....	24
ESCRT-II.....	25
ESCRT-III.....	25
5. Tráfico intracelular de proteínas en tripanosomátidos.....	27
5.1 Aspectos biológicos de los Tripanosomátidos: Generalidades.....	27
5.1.1 Mantenimiento de la arquitectura celular de los tripanosomátidos.....	30
5.1.2 Membrana plasmática y transporte vesicular.....	38
5.2 Relevancia del transporte vesicular en Tripanosomátidos.....	40
5.2.1 Endocitosis en <i>Trypanosoma brucei</i>	42
5.2.1.1 Diferencias entre estadios parasitarios de <i>T. brucei</i>	44
5.2.1.2 Diferencias entre estadios parasitarios en <i>T. cruzi</i>	46
5.3 Regulación del tráfico vesicular por GTPasas Rab.....	48
5.4 Exocitosis en eucariotas superiores y <i>T. brucei</i>	49
5.6 Citoquinesis y Trafico vesicular: generalidades.....	59
5.6.1 ESCRT durante la citoquinesis.....	60
5.6.1.1 ESCRT-III durante la citoquinesis.....	62

5.6.2 Regulación de la citoquinesis celular: Vps32 y Vps4.....	63
5.6.3 Tráfico vesicular y citoquinesis	68
5.6.4 Ciclo celular en <i>T. brucei</i> PCF.....	72
5.6.4.1 Citoquinesis en <i>T. brucei</i> : rol del corset subpelicular.....	73
5.6.5 Puntos de control del ciclo celular de <i>T. brucei</i>	74
5.6.6 Citoquinesis y Transporte vesicular en <i>T. brucei</i>	75
Hipótesis y objetivos	78
Materiales y métodos	81
1.Cultivos bacterianos.....	81
2.Cultivos de parásitos.....	81
3. Soluciones generales.....	82
3.1 Soluciones empleadas en técnicas de ADN y ARN.....	82
3.2 Soluciones empleadas en técnicas de proteínas.....	83
3.3 Soluciones empleadas en técnicas de parásitos.....	83
4. Vectores.....	84
5. Oligonucleótidos.....	87
6. Anticuerpos.....	87
7. Métodos.....	88
7.1 Técnicas de DNA.....	88
7.2 Técnicas de RNA.....	92
7.3 Técnicas con bacterias.....	93
7.4 Técnicas de proteínas.....	93
7.5 Técnicas con parásitos.....	95
8. Análisis in silico.....	102
Resultados	103
Búsqueda y detección de genes Vps32 en <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i>	104
1. Identificación de los genes TcVps32 en <i>Trypanosoma cruzi</i>	104
1.1 Análisis de estructura secundaria de las secuencias candidatas a TcVps32.....	110
1.2 Detección del motivo MIM de TcVps32.....	115
1.3 Análisis de identidad y similitud entre secuencias y proteínas ESCRT-III.....	117

1.4 Análisis del contexto genómico de candidatos TcVps32.....	118
1.5 Amplificación de los genes TcVps32 y confirmación de la identidad.....	120
2. Identificación de los genes TbVps32 en <i>Trypanosoma brucei</i>	121
2.2 Análisis del contexto genómico de los candidatos TbVps32.....	124
2.3 Análisis de Identidad y similitud: TbVps32, Snf7 y CHMP4B	126
2.4 Estructura secundaria de la secuencia candidata TbVps32.....	127
2.5 Detección del motivo MIM de TbVps32.....	128
2.6 Análisis de identidad y similitud entre TbVps32 y proteínas ESCRT-III	130
2.7 Amplificación de los genes y confirmación de la identidad	132
3. Motivos en TcVps32 y TbVps32.....	133
3.1 MIM-1.....	134
3.2 MIM-2: generalidades.....	135
3.3 Elemento INS: generalidades.....	142
3.4 ANCHR	145
APÉNDICE	149
Análisis estructural de Vps32 de <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i>	156
1.1 Búsqueda de homólogos estructurales para TbVps32 y TcVps32	157
1.2 Homólogo estructural Snf7.....	167
1.3 Modelos estructurales (Modelos Alternativos) de TbVps32 y TcVps32.....	168
2. Predicción estructural sin templado.....	171
2.1 Modelo estructural de TbVps32 y TcVps32	171
2.1.1 Validación de los modelos	172
2.2 Comparación estructural de modelos	173
2.2.1 Análisis comparativo de las regiones terminales CTR y NTR	174
2.2.2 Análisis estructural focalizado: MOTIVOS	195
Caracterización funcional de Vps32 en tripanosomátidos	209
1.TcVps32 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	209
2. TbVps32 de <i>Trypanosoma brucei</i> estadio procíclico.....	222
2.1 Estudio funcional de TbVps32 mediante Silenciamiento por RNAi	223
2.1.1 Silenciamiento de TbVps32 y evaluación del ciclo celular	228

2.1.2 Silenciamiento de TbVps32 y transporte vesicular	236
2.2 Estudio funcional de TbVps32 PCF mediante sobreexpresión inducida	241
2.2.1 Sobreexpresión de HA-TbVps32 y transporte vesicular	245
3. TbVps32 de <i>T. brucei</i> estadio sanguíneo	254
APÉNDICE II.....	258
Discusión	260
Conclusiones	301
Bibliografía	304

Introducción

Las enfermedades parasitarias han sido históricamente asociadas con poblaciones vulnerables, de bajos ingresos o recursos limitados. Sin embargo, los patrones contemporáneos de movilidad humana, impulsados por la globalización, han transformado esta concepción. El desplazamiento de la población hacia nuevas regiones geográficas ha favorecido la expansión de patologías parasitarias a contextos socioeconómicos diversos. En consecuencia, enfermedades parasitarias exclusivas de zonas empobrecidas o determinadas regiones endémicas, han comenzado a surgir en otras zonas geográficas e, incluso, en países con mayores recursos y sistemas de salud más avanzados (Belaunzarán, 2015; Steverding, 2020). En este escenario, es notable la gran capacidad de los parásitos para adaptarse a nuevos entornos y hospedadores, lo cual ha sido fundamental en su éxito evolutivo y su impacto sanitario. Este fenómeno es descrito muy bien por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, organismos versátiles en el desarrollo de mecanismos adaptativos. Su notable plasticidad les ha permitido sobrevivir y prosperar en condiciones adversas, experimentando desde cambios en sus mecanismos de evasión inmune hasta la optimización de estrategias metabólicas y de transmisión (Steverding, 2020). Este fenómeno no sólo subraya la complejidad de su biología, sino que también plantea retos significativos en términos de prevención, diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades en un mundo interconectado. Si bien estos organismos han sabido desarrollar varios mecanismos para mantener su homeostasis celular, en la presente tesis doctoral nos centraremos en uno de ellos: el transporte o tráfico vesicular. Este proceso conservado a lo largo de la evolución entre los eucariotas ha garantizado su supervivencia y proliferación, siendo fundamental tanto para el desarrollo normal de los ciclos de vida, la comunicación célula-célula y la infectividad. En la presente tesis, se abordará el estudio del transporte vesicular de ambos tripanosomátidos en el contexto de la proteína Vps32 (Vacuolar Protein Sorting), miembro de la maquinaria celular ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), una maquinaria altamente conservada y partícipe de infinidad de procesos celulares dirigidos hacia las membranas.

1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas conocida como tripanosomiasis americana, es una patología parasitaria sistémica, crónica, transmitida por vectores y causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad es endémica en países de América Latina, principalmente en zonas rurales, aunque la globalización ha llevado a su detección en otros continentes ([https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))). La transmisión de la enfermedad de Chagas ocurre principalmente a través de la picadura de insectos triatominos infectados, tales como *Triatoma infestans*, aunque también puede ocurrir por transfusión de sangre, trasplante de órganos, de manera congénita y por ingestión de alimentos contaminados (Prata, 2001). La enfermedad de Chagas presenta dos fases: la fase aguda y la fase crónica (Belaunzarán, 2015; Prata, 2001). La fase aguda inicial dura aproximadamente dos meses tras la infección y aunque se observa un gran número de parásitos circulantes en sangre, en la mayoría de los casos no aparecen síntomas o los mismos son leves e inespecíficos (fiebre, dolor de cabeza, ganglios linfáticos agrandados, palidez, dolor muscular, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico). Con mucha menor frecuencia, las personas picadas por un triatomino presentan los signos iniciales visibles característicos, que pueden ser una lesión cutánea o una hinchazón amoratada de un párpado (Signo de Romaña). Durante la fase crónica, los parásitos permanecen principalmente en los músculos cardíaco y digestivo, por lo que los pacientes sufren trastornos cardíacos y alteraciones digestivas (típicamente, aumento del tamaño del esófago o del colon), neurológicas o mixtas (Belaunzarán, 2015; Nunes et al., 2013; Prata, 2001). Un diagnóstico erróneo o tardío, con un tratamiento y seguimiento inexistentes o incompletos, puede hacer que esta infección sea potencialmente letal.

La enfermedad de Chagas puede tratarse con benznidazol o con nifurtimox. Ambos medicamentos matan el parásito y son plenamente eficaces para curar la enfermedad si se administran al comienzo de la fase aguda e incluso en los casos de transmisión congénita (Belaunzarán, 2015). Sin embargo, su eficacia disminuye cuanto más tiempo lleve una persona infectada sin tratamiento. En otros casos, los posibles beneficios del tratamiento a la hora de

prevenir o retrasar el avance de la enfermedad de Chagas deben sopesarse frente a la duración del tratamiento (hasta dos meses) y las posibles reacciones adversas (Castro et al., 2006; Jackson et al., 2010).

A causa del gran número de animales silvestres que sirven de reservorio a este parásito, la infección no puede erradicarse (Nunes et al., 2013; Steverding, 2020). En vez de ello, las metas de salud pública consisten en la eliminación de la transmisión a humanos, el acceso temprano a la atención de salud y el seguimiento de por vida de las personas infectadas. No hay vacuna para prevenir la enfermedad, sin embargo, se están realizando avances significativos en su desarrollo. Actualmente, los Investigadores de la Universidad de Buenos Aires (UBA) han creado una vacuna nombrada *Cruzivax* (Pinazo et al., 2024) diseñada para ser administrada por vía nasal, que ha superado con éxito las pruebas preclínicas en modelos animales y ha demostrado ser segura y efectiva en estos estudios. Por otro lado, la Universidad Nacional de Rosario (UNR) ha desarrollado otra vacuna nasal contra el Chagas, que actualmente se encuentra en fase experimental (Pacini et al., 2024).

2. Enfermedad del sueño

La tripanosomiasis africana humana, conocida como la enfermedad del sueño, es causada por el parásito *Trypanosoma brucei*. Este parásito es transmitido al ser humano a través de la picadura de la mosca tsé-tsé (*Glossina sp.*) infectada con los parásitos adquiridos luego de picar a humanos o animales infectados. Este vector habita en el África Subsahariana, pero sólo ciertas especies de mosca tse-tsé son capaces de transmitir la enfermedad. La picadura de la mosca (infectada) provoca la aparición del llamado chancro. Dos o tres semanas después, la enfermedad evoluciona a un estado hemolinfático I y luego al estadio meningoencefalítico II (Ponte-Sucre, 2016). El estadio hemolinfático I se caracteriza por la aparición de episodios febriles intermitentes, adenopatías, esplenomegalia e incluso alteraciones hepáticas. El estadio meningoencefalítico II aparece lentamente en meses o años, dependiendo del tripanosoma. Los parásitos cruzan la barrera hematoencefálica para infectar el sistema nervioso central (SNC), causando la aparición de las manifestaciones neurológicas como alteración de los patrones de sueño, confusión y dificultad para coordinar. En la fase terminal

de la enfermedad, son comunes los trastornos de la consciencia y el desarrollo de demencia con incoherencia, incontinencia doble y convulsiones epilépticas.

La Enfermedad se transmite con poca frecuencia por transfusión de sangre (Franco et al., 2014). La enfermedad causa infertilidad y aborto espontáneo en humanos; por lo tanto, la transmisión por vía placentaria es incierta. La transmisión oral, sangre-sangre (p. ej., por contacto sexual) e iatrogénica (con agujas contaminadas) podrían tener un impacto ocasional (Franco et al., 2014).

La enfermedad adopta dos formas en función de la subespecie del parásito. De esta manera, *T. brucei gambiense*, que se encuentra en 24 países de África occidental y central, representa en la actualidad el 92% de los casos notificados y causa una enfermedad de larga latencia y cronicidad ([https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))) (Franco et al., 2014; Ponte-Sucre, 2016). Es por ello por lo que una persona puede llevar meses o incluso años infectada sin presentar signos y síntomas y cuando estos se manifiestan, es frecuente que la enfermedad ya esté en un estado avanzado y haya afectado al SNC. Por otro lado, *T. brucei rhodesiense* se encuentra en 13 países de África oriental y meridional y representa el 8% de los casos notificados provocando una enfermedad aguda que evoluciona rápidamente y ataca a múltiples órganos, incluido el cerebro (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-sleeping-sickness>). Esta enfermedad es zoonótica y poco frecuente; los pacientes fallecen a menudo en pocos meses. Lamentablemente, no existe una vacuna ni un fármaco recomendado para prevenir la tripanosomiasis africana (occidental u oriental) (Greca & Magez, 2011). La enfermedad que afecta al ganado de África recibe el nombre de *nagana* y los animales domésticos y salvajes son el principal reservorio del agente patógeno. Asimismo, los animales también pueden infectarse por *T. b. gambiense* y posiblemente servir de reservorio.

El tipo de tratamiento depende de la forma y la etapa de la enfermedad. En 2019, la OMS publicó nuevas directrices para el tratamiento de la infección producida por *T. b. gambiense* (<https://www.who.int/news/item/08-08-2019-who-publishes-new-guidelines-for-the->

treatment-of-sleeping-sickness) (WHO, 2019). Sin embargo, estos tratamientos se encuentran asociados con severos efectos adversos lo cual implica su evaluación previa y constituye una problemática a la hora de tratar a los pacientes.

3. Los Tripanosomátidos

3.1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, presenta una compleja alternancia entre diferentes formas morfológicas, permitiendo su adaptación y supervivencia en dos ambientes distintos: el insecto vector (triatominos) y el huésped mamífero (Storino, 2023). Cada estadio presenta características biológicas y moleculares específicas para garantizarle la supervivencia, multiplicación y la consecuente transmisión (Souza et al., 2017; M. Vazquez, 2007).

En primera instancia, una vez que un triatolino se alimenta de un huésped infectado, ingiere tripomastigotes que llegan al intestino medio del insecto. En esta región, los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes, la forma replicativa que se multiplica mediante fisión binaria. Los epimastigotes son móviles y poseen un flagelo que facilita su desplazamiento a lo largo del epitelio intestinal del vector. Estas formas proliferan activamente en el intestino medio, incrementando la carga parasitaria en el vector. En el intestino posterior y el recto del triatolino, los epimastigotes sufren un proceso de diferenciación conocido como metaciclogénesis, generando tripomastigotes metacíclicos. Estas formas son no replicativas, pero altamente infectivas para el huésped mamífero. Luego de su alimentación, el insecto defeca cerca del sitio de la picadura. Los tripomastigotes metacíclicos son excretados con las heces del insecto y pueden penetrar la piel o mucosas del huésped. Al ingresar e infectar al huésped, los tripomastigotes metacíclicos invaden diferentes tipos de células a través de la formación de la vacuola parasitófora, la cual protege temporalmente al parásito del sistema inmune del huésped. Dentro de esta vacuola, los tripomastigotes se transforman en amastigotes, estadio intracelular y replicativo del parásito en el huésped mamífero. Los mismos, se multiplican por fisión binaria dentro de las células de diversos tejidos tales como el corazón y el sistema reticuloendotelial. Este crecimiento intracelular termina por lisis la

célula huésped, liberando nuevos tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes sanguíneos liberados a la sangre son formas móviles e infectivas, capaces de infectar otras células del huésped o ser ingeridos por un nuevo triatomo durante una alimentación sanguínea. Estas formas no se replican en la sangre, pero son clave para la propagación del parásito y su transmisión a nuevos vectores (Tyler & Engman, 2001). La habilidad de *T. cruzi* para alternar entre formas replicativas (epimastigotes y amastigotes) y formas infectivas no replicativas (tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos) subyace a la cronicidad y severidad de la enfermedad de Chagas: los tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos son funcionales para la invasión celular y la diseminación sistémica en el huésped, mientras que los amastigotes son responsables del daño tisular debido a su replicación intracelular.

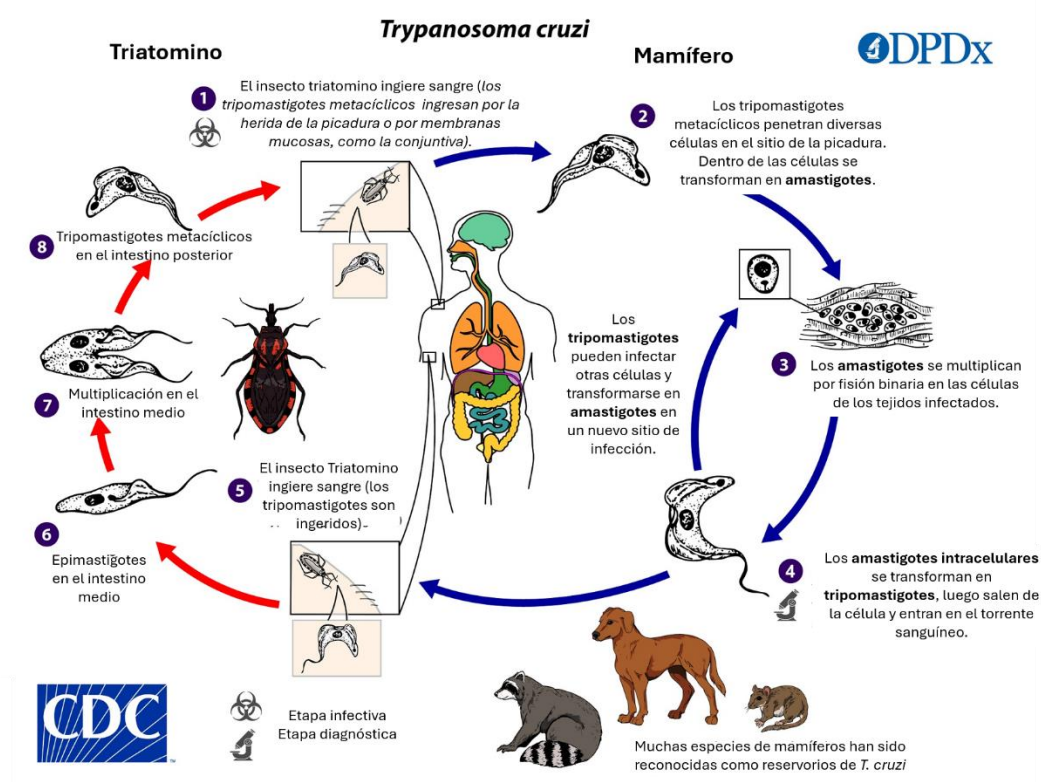


FIGURA 1. Ciclo de vida de *T. cruzi* (<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican>).

3.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*

T. brucei es un parásito digenético que presenta un ciclo de vida complejo alternando entre dos hospedadores: la mosca tsé-tsé (*Glossina spp*), que constituye el insecto vector, y el

mamífero. El hospedador mamífero puede incluir a seres humanos como así también a reservorios animales, tanto salvajes como domesticados (Field & Carrington, 2009).

El ciclo comienza cuando la mosca infectada pica e inocular los tripomastigotes metacíclicos, no proliferativos, presentes en sus glándulas salivales, en el torrente sanguíneo del hospedador mamífero. Los tripomastigotes metacíclicos presentan una superficie celular cubierta de glicoproteínas variables de superficie (VSG) en la cara externa de la membrana celular que lo protegen del sistema inmune del huésped y asegura su persistencia en el torrente sanguíneo (Matthews, 2005). Luego, los tripomastigotes se diferencian a la forma proliferativa sanguínea que, adquieren una morfología delgada o "*slender*" cuando se dividen. El incremento numérico de estas formas parasitarias provoca el reemplazo por formas cortas o "*stumpy*" no proliferativas (Langousis & Hill, 2014). Esto se lleva a cabo como un mecanismo adaptativo por parte del parásito para favorecer su supervivencia, ya que la acumulación de las formas parasitarias quiescentes limita el aumento de la densidad celular, favoreciendo así la extensión de la vida del huésped y, en consecuencia, la persistencia de la infección. Al mismo tiempo, garantiza mayor probabilidad de transmisión de la enfermedad al asegurar una considerable dotación de parásitos preparados para infectar a la mosca. Asimismo, la forma parasitaria "*short stumpy*" queda detenida en la fase G1 del ciclo celular con el objetivo de reiniciarlo cuando se encuentre en el interior del insecto vector. Por lo tanto, los cambios morfológicos y la densidad celular parecen estar coordinados con el reinicio de un nuevo ciclo celular (Matthews, 2005).

Cuando la mosca tsé-tsé pica a un mamífero infectado, la forma "*short stumpy*" se establece en el intestino del insecto y se diferencia a la forma procíclica del parásito reanudando el ciclo celular. La forma procíclica es proliferativa y expresa a la proteína Prociclina en su superficie celular. Durante este estadio, el parásito detiene su división una vez establecido en el intestino y migra hacia las glándulas salivales de la mosca.

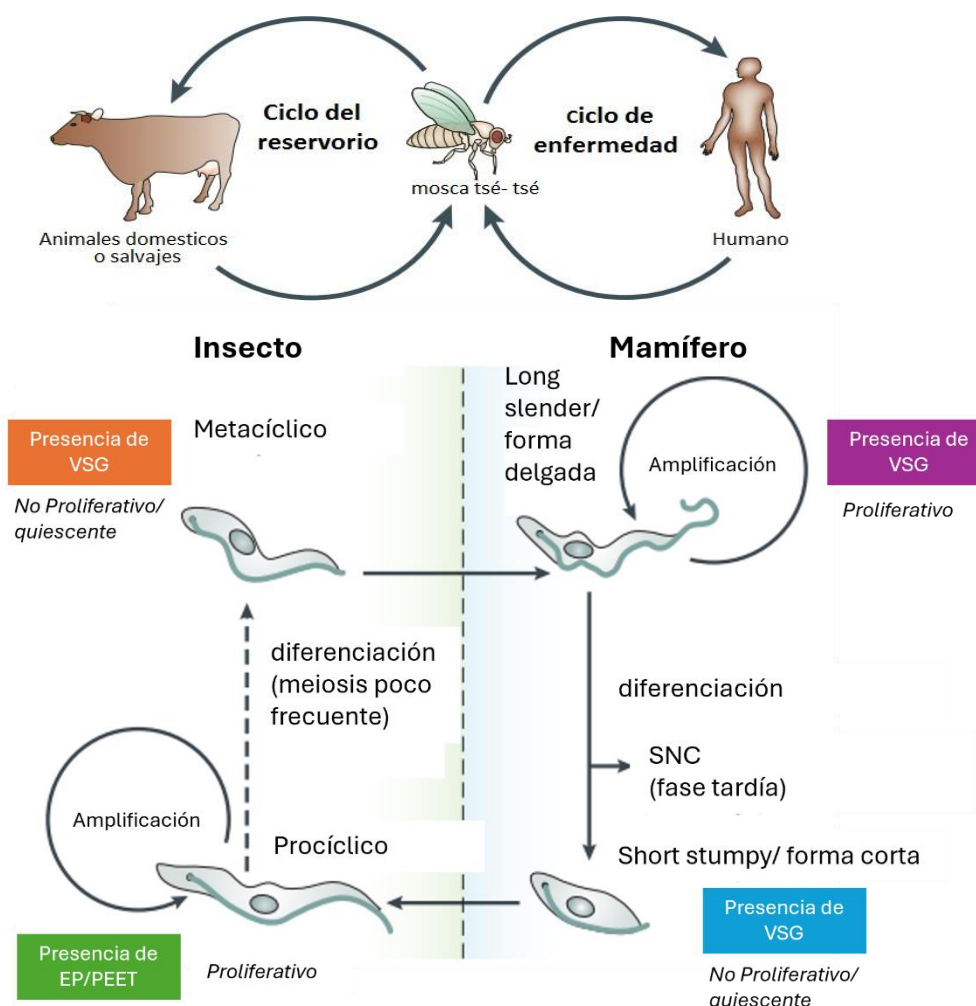


FIGURA 2. Ciclo de vida de *T. brucei*. Arriba. Ciclo dual entre la mosca tsé-tsé, los seres humanos y los reservorios animales (animales silvestres nativos como animales domésticos agrícolas). Abajo. Ciclo de vida simplificado que enfatiza la alternancia entre amplificación y diferenciación. Notar cómo va cambiando la dotación proteica de la superficie celular de cada uno de los estadios. GPEET: Prociclina que se encuentra en la superficie de las formas de cultivo procíclicas de *T. brucei*, EP: Prociclinas, repeticiones de ácido glutámico (E) y prolina (P). Esquema adaptado de Field & Carrington, 2009.

Los tripomastigotes procíclicos se unen al epitelio de la glándula salival de la mosca, donde se produce una división asimétrica generando epimastigotes largos y epimastigotes cortos. Los epimastigotes cortos quedan unidos a las células epiteliales de la glándula salival a través del flagelo. En esta etapa, los parásitos se replican, se diferencian a tripomastigotes metacíclicos y quedan libres en el lumen de la glándula salival, donde permanecen con su ciclo celular arrestado hasta que la mosca se alimenta de un huésped mamífero y se reactiva el ciclo infeccioso (Langousis & Hill, 2014; Matthews, 2005).

TRANSPORTE O TRÁFICO VESICULAR

Las transiciones entre las distintas formas morfológicas de *T. cruzi* responden a cambios ambientales específicos como la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes. Estas transiciones permiten al parásito ajustar su metabolismo y estructura para colonizar eficientemente los diversos nichos presentes en cada etapa de su ciclo. Por lo tanto, la alternancia entre estadios parasitarios, estructural y funcionalmente específicos, demuestra la gran capacidad de adaptación de ambos tripanosomátidos en pos de su supervivencia, persistencia y progresión de la infección. Estos procesos se llevan a cabo gracias a la capacidad de estos organismos de modificar su arquitectura celular, el metabolismo primario, la expresión génica y el transporte intracelular. De acuerdo con ello, a continuación, serán abordadas las características y los mecanismos generales de transporte vesicular en eucariotas poniendo foco en la endocitosis, para luego abordar la implicancia, las características y el mecanismo de reclutamiento de la maquinaria ESCRT y de Vps32 en eucariotas.

4. Tráfico vesicular en eucariotas.

El tráfico vesicular consiste en el transporte de diversas macromoléculas (carga) a través de vesículas que se mueven dentro del sistema de endomembranas, el cual se encuentra compuesto por estructuras subcelulares definidas de la vía endocítica y de la vía secretora. La vía endocítica engloba a estructuras tales como los endosomas y el lisosoma, mientras que el retículo endoplasmático rugoso (REG), el aparato de Golgi y las vesículas secretoras, conforman la vía secretora (Képè et al., 2005) **(FIGURA 3)**.

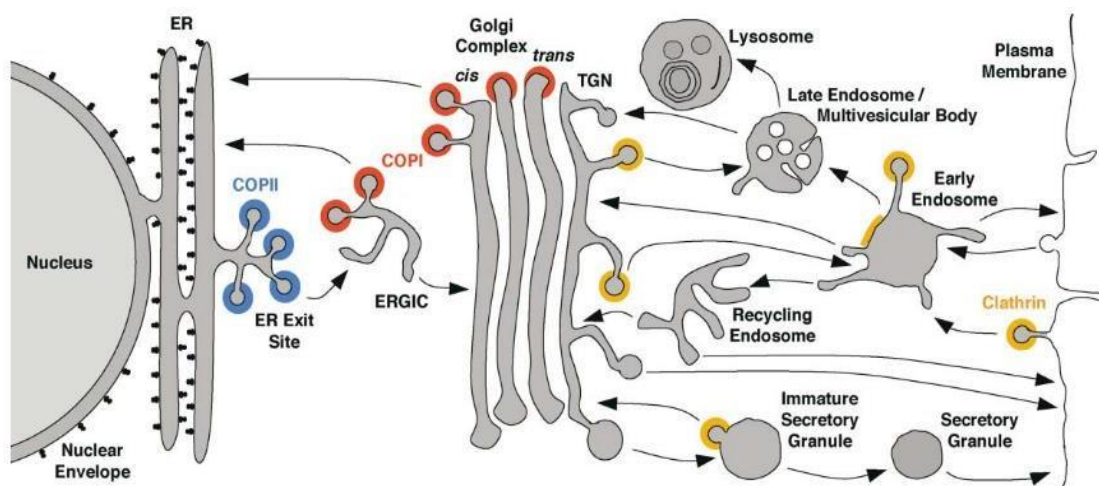


FIGURA 3. Tráfico intracelular en eucariotas. El esquema destaca los compartimentos de la vía secretoria, vacuolar/lisosomal y endocítica. Cada una de las etapas del transporte están indicadas mediante flechas y los colores indican las localizaciones conocidas o presumidas de COP- II (azul), COP- I (rojo) y clatrina (amarillo). Esquema extraído Bonifacino & Glick, 2004.

El proceso general de la biogénesis vesicular involucra un compartimento *donor* y un compartimento *aceptor* (**FIGURA 4**). El compartimento *donor* experimenta un cambio de curvatura de su membrana que comienza a dar forma a la nueva vesícula, al tiempo que se reclutan proteínas y otras macromoléculas específicas a transportar. Luego del reclutamiento y formación de la vesícula, se produce su brotación o *budding*, para lo cual se generó la constricción y escisión de la membrana del cuello de la vesícula. Luego, esta vesícula migra y se fusiona con la membrana del compartimento aceptor, lo cual provoca la liberación de su contenido, ya sea en el espacio extracelular o en la luz del compartimento subcelular (Bonifacino & Glick, 2004). Durante este proceso de formación de vesículas transportadoras del sistema secretor y endocítico, participan diversas proteínas de la cubierta, proteínas adaptadoras e, incluso, proteínas Rab GTPasas (Bonifacino Juan & Lippincott-Schwartz Jennifer, 2003).

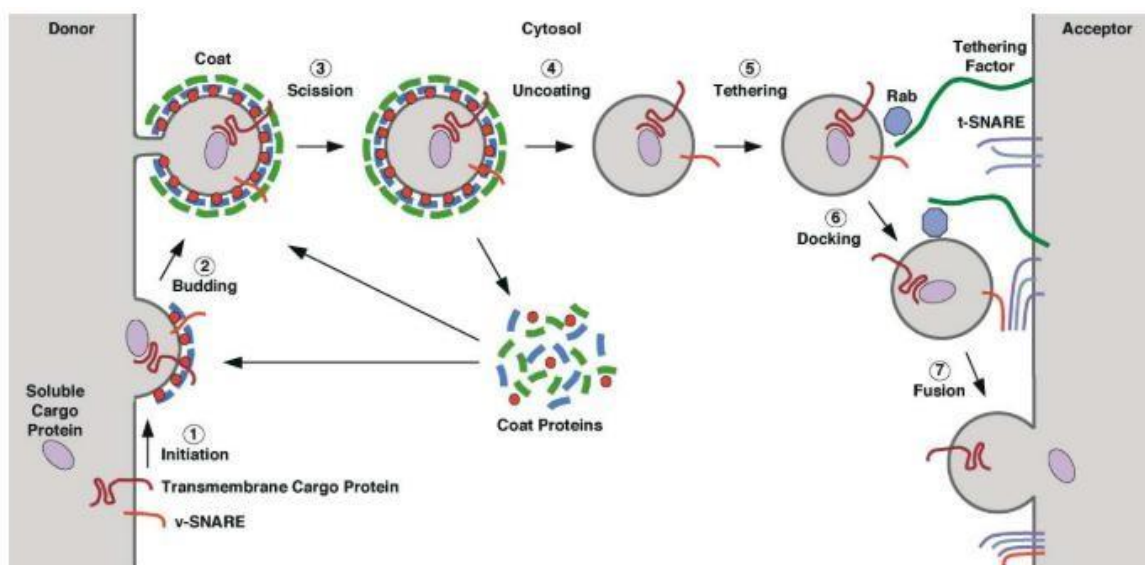


FIGURA 4. Esquema general de la formación de vesículas desde un compartimento donador al aceptor.

1. Inicio del ensamblaje de la cubierta. Los componentes de la capa proximal a la membrana (azul) se reclutan al compartimento *donor*. Las proteínas de carga transmembrana interactúan con la carga y las SNARE comienzan a reclutarse a la cubierta mediante un proceso de ensamblado. 2. Los componentes de la cubierta distal a la membrana (verde) se agregan y polimerizan en una estructura entramada. La carga se concentra y la curvatura de la membrana aumenta. 3. Escisión. Se produce por acción directa de la cubierta o por proteínas accesorias sobre la membrana del cuello de la vesícula. 4. Desprendimiento de la capa. La vesícula pierde su cubierta debido a la inactivación de las GTPasa, la hidrólisis de fosoinositidos y la acción de enzimas de desprendimiento de la capa. Las proteínas de la capa citosólica luego se reciclan para rondas adicionales de formación y brotación de vesículas. 5. Anclaje: la vesícula "desnuda" se desplaza hacia el compartimento aceptor, guiada por el citoesqueleto y por GTPasas Rab. 6. Acoplamiento: Las v-SNARE y t-SNARE se ensamblan en un haz de cuatro hélices. 7. Este "complejo trans-SNARE" promueve la fusión de la vesícula y las bicapas lipídicas del aceptor. La carga se transfiere al compartimento aceptor y las SNARE se reciclan. Esquema extraído de Bonifacino & Glick, 2004.

4.1 Endocitosis: generalidades

La endocitosis constituye un mecanismo celular fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular, propiedad que, por definición, permite a un organismo ajustar y adaptar su medio interno a los cambios externos propuestos. Para tal fin, las células poseen estructuras especializadas que integran el sistema endocítico y el lisosoma, pero también es fundamental la membrana plasmática. La membrana plasmática constituye la interfaz entre la célula y el entorno, involucrada en la señalización y el punto de partida de la endocitosis. Globalmente, mediante la vía endocítica, las células eucariotas internalizan proteínas de la

membrana plasmática y moléculas extracelulares para diversos procesos fisiológicos, incluida la absorción, la degradación, la señalización celular y el reciclaje de nutrientes. Generalmente, hay dos tipos de endocitosis: fagocitosis y pinocitosis (Conner & Schmid, 2003). La fagocitosis ocurre predominantemente en células especializadas como macrófagos, monocitos y neutrófilos y se internalizan moléculas o partículas de hasta 15 μm o, incluso, del mismo tamaño de la célula. En este caso, las estructuras que se forman son los fagosomas, endosomas más grandes que los endosomas clásicos, y los fagolisosomas, estructuras más grandes que los lisosomas. Por el contrario, la pinocitosis ocurre en la mayoría de los tipos de células de mamíferos, y puede categorizarse en al menos cuatro vías diferentes: la vía de internalización dependiente de clatrina, y tres vías de internalización independientes de clatrina: macropinocitosis, internalización dependiente de *rafts* y caveolas e internalización dependiente de *raft* y de caveolas (Lajoie & Nabi, 2007; McMahon & Boucrot, 2011) (FIGURA 5).

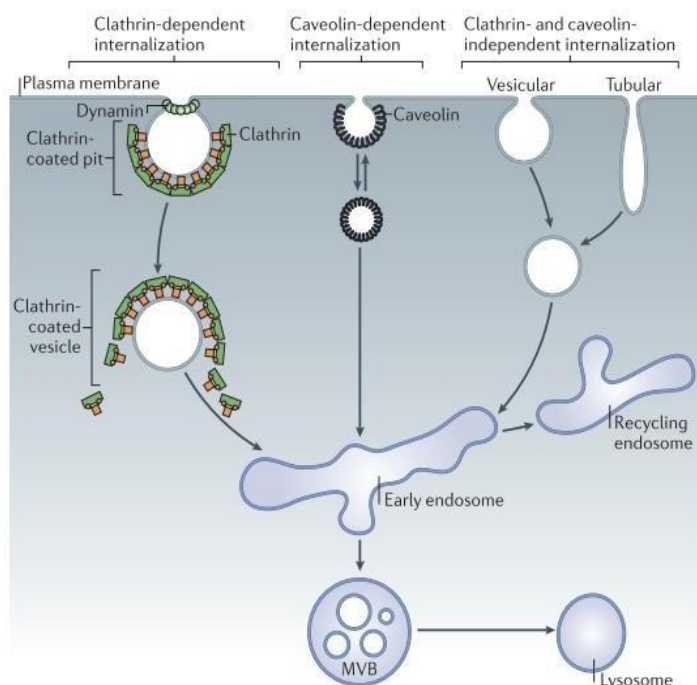


FIGURA 5. Vías de internalización dependientes e independientes de la clatrina. Existen múltiples vías de endocitosis en las células: la internalización dependiente de clatrina, la dependiente de caveolina y la independiente de clatrina y caveolina. La endocitosis mediada por clatrina es la vía más caracterizada, mientras que la vía dependiente de caveolas funciona en paralelo, pero sus cargas específicas no están bien definidas. Las vías independientes de la clatrina y la caveolina requieren una caracterización molecular más profunda (McMahon & Boucrot, 2011).

La macropinocitosis suele ocurrir en un tipo especial de subdominios de membrana (volantes de membrana) y la internalización se produce en vesículas de tamaños superiores a los 500 nm de diámetro. La endocitosis constitutiva o de fase fluida es un proceso no selectivo durante el cual se capta líquido, moléculas disueltas y partículas de hasta 150 nm mediante un mecanismo dependiente de clatrina e independiente, y cumple una función esencial para la internalización de nutrientes disueltos y la eliminación de sustancias del medio extracelular que podrían interferir con la función celular. Por otra parte, la endocitosis mediada por receptor constituye un mecanismo de captación de la carga de manera selectiva a través de receptores, dependiente o no de clatrina. Se produce la captación de macromoléculas disueltas y específicas de hasta 150 nm en vesículas que se fusionan con endosomas.

En células eucariotas, la vía endocítica predominante se desarrolla bajo la dependencia de la clatrina y, de hecho, es el proceso mejor caracterizado. El mecanismo general de la endocitosis consta de la internalización de la *carga* desde la membrana plasmática y su transporte mediante endosomas (Kaksonen & Roux, 2018) **(FIGURA 3)**. Si esa carga debe degradarse, la vía a seguir será la que incluye al lisosoma, pero por si, al contrario, esa carga debe ser reciclada, la misma retorna a la membrana plasmática. De acuerdo con ello, durante el proceso de endocitosis en células animales, la carga es internalizada desde la membrana plasmática y es secuestrada en vesículas. La carga transportada en vesículas es incorporada a los endosomas tempranos (*Early endosomes* o EE) y luego es transferida a los endosomas de reciclaje (*Recycle Endosomes* o RE) desde los cuales retornan a la membrana plasmática o la superficie celular lentamente. Alternativamente, la carga forma parte de los cuerpos multivesiculares (MVB), los cuales son estructuras especializados de los endosomas tardíos que se encuentran compuestos por vesículas intraluminales (ILVs), por lo cual se infiere que los MVB son una etapa madurativa de los endosomas tardíos. Posteriormente, los MVB se fusionan con los endosomas tardíos y los lisosomas para su degradación. Alternativamente, durante la endocitosis una *carga* puede ser transportada desde el Golgi al endosoma tardío y luego hacia el lisosoma o incluso ser transportada hacia un endosoma temprano y dirigirse a

la membrana plasmática a través de la vía de reciclaje (Bonifacino & Glick, 2004).

En levaduras, se distinguen tres compartimentos endocíticos funcionalmente distintos: las vacuolas, los endosomas tempranos y los endosomas tardíos. Tal como en células de mamífero, estos endosomas poseen proteínas miembros de la maquinaria ESCRT, la cual participa en la formación de vesículas y los MVB, cuya existencia es transitoria y previa a la fusión con la vacuola (Odorizzi et al., 1998).

El transporte vesicular requiere la actividad de varias GTPasas de la subfamilia Rab, que actúan como interruptores moleculares para controlar los pasos del tráfico intracelular mediante ciclos de unión a GTP (estado activo) y a GDP (estado inactivo). Cada subclase de endosomas puede ser reconocida por la dotación de proteínas en sus membranas, especialmente de aquellas proteínas miembros de la familia Rab, como así también por los distintos pH lumenales (Rink et al., 2005; Zerial & McBride, 2001). De esta manera, en mamíferos los endosomas tempranos han sido descriptos como organelas vacuolares asociados a extensiones membranosas y tubulares que presentan microdominios con proteínas Rab, tales como Rab4, Rab5, Rab10, Rab14, Rab21, and Rab22 (Kiss & Nilsson, 2014). Por su parte, el endosoma de reciclaje está compuesto por estructuras tubulares dinámicas asociadas a Rab11 y Rab8. Respecto al pH luminal, el endosoma tardío y el lisosoma son los compartimentos ácidos de la vía. El endosoma tardío presenta bombas de protones en sus membranas que propician la disminución del pH intraluminal y cuando esto sucede, los endosomas tardíos en realidad funcionan como lisosomas, produciéndose la digestión del contenido de la vesícula.

En este punto, es importante destacar que, a fines prácticos, la ruta hacia el lisosoma es descripta incluyendo distinta subclases de endosomas, sin embargo, la ruta endocítica es dinámica y los endosomas van madurando (cambio de composición) a estructuras más complejas a lo largo de la vía. De esta manera, un endosoma temprano da formación a un endosoma de reciclaje o madura a endosoma tardío, que luego se fusiona con estructuras degradativas como lo son los lisosomas. Estos cambios se encuentran ejemplificados en los estudios de microscopia llevados a cabo en células vivas en los cuales se sugiere que la

maduración de los MVB se encuentra asociada al reemplazo gradual de Rab5 por Rab7 en asociación con los endosomas tardíos (Langemeyer et al., 2020).

Vesículas

Se distinguen distintos tipos de vesículas participantes de distintos procesos celulares, cuyos mecanismos de biogénesis son específicos y, por lo tanto, poseen características moleculares particulares. Las mismas se representan esquemáticamente en la **FIGURA 6**.

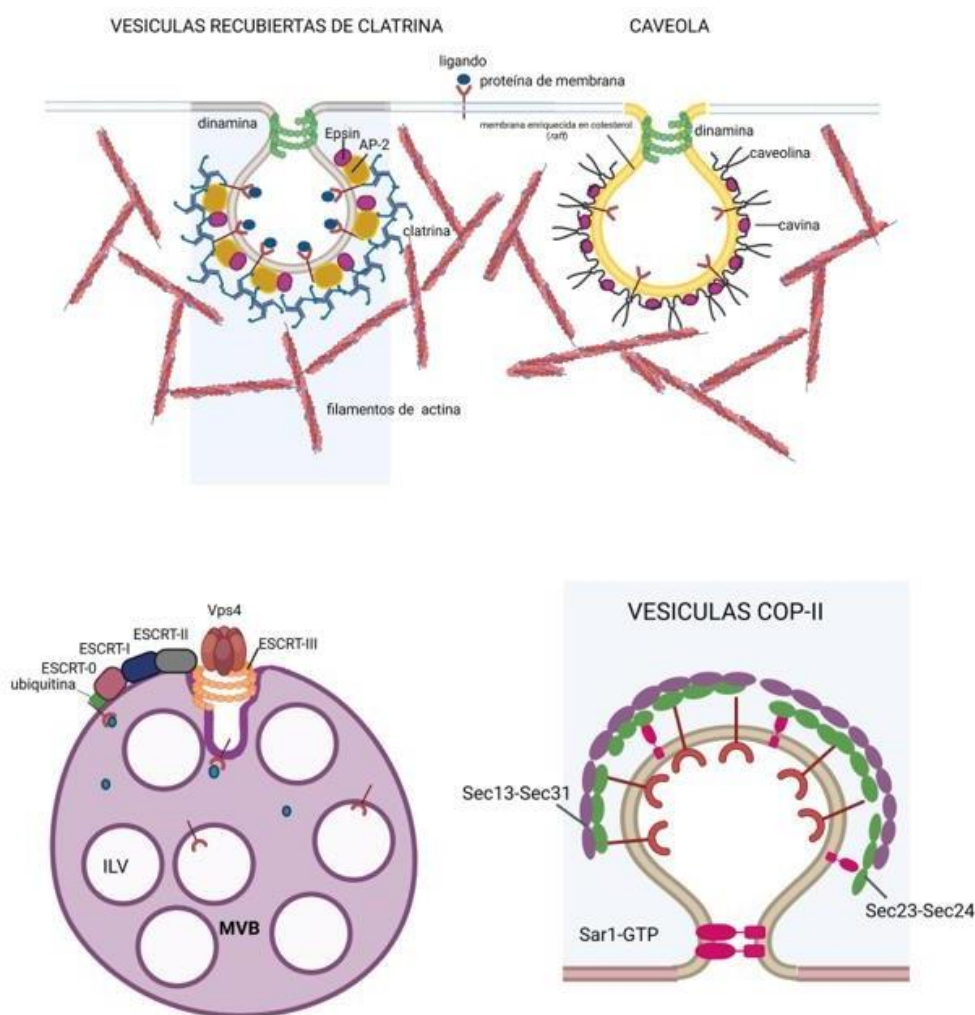


FIGURA 6. Distintos tipos de vesículas y sus maquinarias de formación en las células. Para la formación y brotación de vesículas recubiertas de clatrina y para las caveolas, es requerida la dinamina. Para la formación de vesículas COP-II desde el RE, participa Sar1-GTP. Para la biogénesis de los cuerpos Multivesiculares (MVB), compuestos por ILVs, es requerida la maquinaria ESCRT y la ATPasa Vps4. Imagen creada con <https://BioRender.com>.

4.1.1 Vesículas recubiertas de clatrina

La gemación de vesículas recubiertas por clatrina desde la membrana plasmática genera vesículas de tamaño entre 60-100 nm de diámetro (Bonifacino Juan & Lippincott-Schwartz Jennifer, 2003). Las moléculas de clatrina son trímeros compuestos de tres cadenas pesadas, cada una asociada a una liviana, a través de un núcleo central o *core* (Crowther & Pearse, 1981; Kaksonen & Roux, 2018). Debido a esta estructura, los trímeros de clatrina son denominados triskeliones que pueden conectar con otras moléculas para formar látigos o estructuras en forma de cubierta o caja (**FIGURA 6**). La red de clatrina impulsa la remodelación y estabilización de la curvatura de la membrana lo cual determina la formación y la gemación de la vesícula (Bonifacino & Glick, 2004; Hinrichsen et al., 2006). El mecanismo de reclutamiento de clatrina a la membrana mecanismo puede apreciarse en la **FIGURA 7**. En todo este mecanismo, cobra relevancia la participación de la adaptina, proteína que une la clatrina a la membrana vesicular y selecciona las moléculas que se empaquetarán en la vesícula.

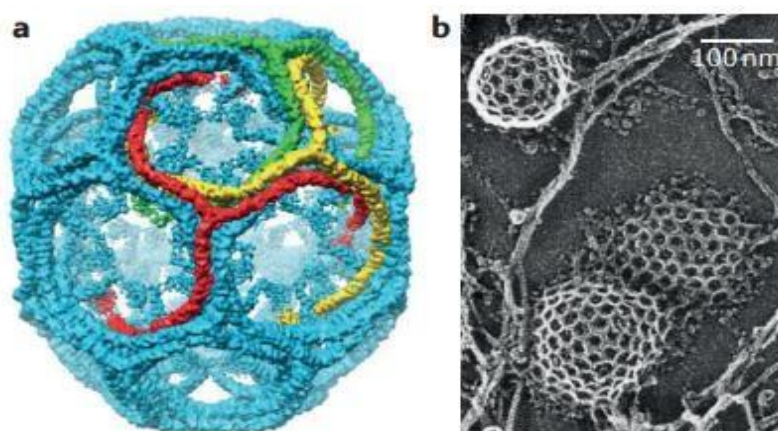


FIGURA 7. Estructura de la Clatrina. A. Estructura de “caja” de clatrina obtenida mediante criomicroscopía electrónica Fotin et al., 2004. Los triskeliones individuales se encuentran resaltados en rojo, verde y amarillo. B. Redes de clatrina de que se visualizaron mediante microscopía electrónica en la superficie de una membrana plasmática de fibroblastos Heuser & Anderson, 1989.

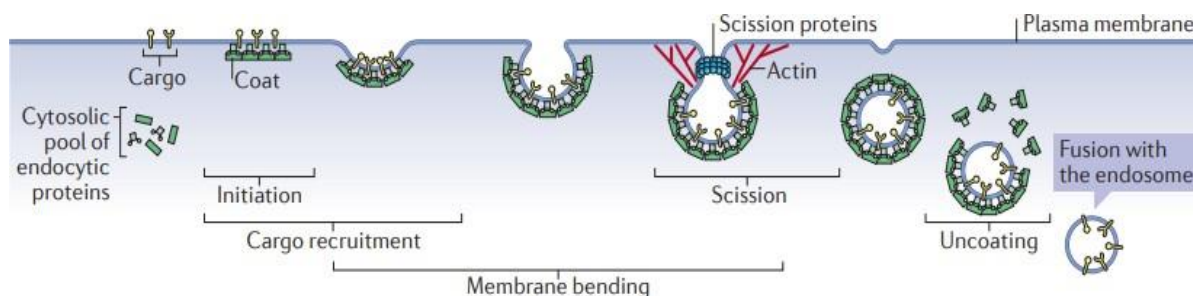


FIGURA 8. Endocitosis mediada por clatrina. Inicialmente, se recluta la carga en el sitio de inicio de la endocitosis y la membrana comienza a curvarse hasta envolver completamente la carga mediante un proceso de invaginación. Finalmente, la escisión de la membrana separa la vesícula de la membrana plasmática. Luego, se produce la pérdida del recubrimiento compuesto por proteínas de la maquinaria endocítica, las cuales vuelven a ser parte de un nuevo depósito citosólico y se libera una vesícula que participa en eventos de tráfico intracelular de membrana (Kaksonen & Roux, 2018).

4.1.2 Vesículas intraluminales (ILV) y cuerpos Multivesiculares (MVB)

Un paso clave del tráfico vesicular hacia el lisosoma es la biogénesis de los MVB. Los cuerpos multivesiculares (MVB), estructuras especializadas de los endosomas tardíos, se forman cuando segmentos de su membrana limitante invaginan y brotan hacia el lumen del compartimento, generando vesículas intraluminales (ILV) (Babst, 2011a). Durante la fusión de los MVB con el lisosoma, estructura conocida como endolisosoma, se produce la liberación de las ILV con todo su contenido de lípidos y proteínas a la luz lisosomal, contenido que es digerido por las hidrolasas lisosomales que actúan a pH ácido ($\text{pH} < 5$) (Babst, 2011a, 2011b; Henne et al., 2011; Katzmann et al., 2001; Odorizzi et al., 1998). Por lo tanto, el proceso de degradación mediante la vía de los MVB es esencial para el reciclaje o recambio de proteínas y lípidos transmembrana en células eucariotas, asegurando la homeostasis y funcionalidad celular.

La biogénesis de MVBs depende de la maquinaria ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), la cual regula la creación de ILV asegurando tanto la especificidad como la eficiencia en la clasificación de las proteínas (Rusten & Stenmark, 2009). Además, a través de la maquinaria ESCRT, se produce su maduración a endosomas tardíos esféricos o MVB repletos de múltiples ILV de tamaños uniforme (Babst, 2011a; Woodman & Futter, 2008). A diferencia de otras rutas, el complejo ESCRT permite la incorporación de proteínas a las ILVs sin requerir dominios especializados de interacción lipídica, ya que, en la mayoría de las proteínas transmembrana, la ubiquitina actúa como señal de clasificación y reclutamiento al MVB

(Babst, 2011a, 2011b; Hurley, 2010). Al respecto, en general, las proteínas transmembrana destinadas al lisosoma poseen una marca específica de ubiquitina, distinta a la de las cadenas de poliubiquitina asociadas con la degradación en el proteasoma. Por tanto, en este caso, la monoubiquitinación facilita la entrada a la ruta endocítica, mientras que las cadenas de poliubiquitina en Lys48 se dirigen al proteasoma (Babst, 2011b; Piper & Lehner, 2011).

El proceso de formación de ILV y MVB es topológicamente inverso al de otras vesículas (recubiertas de clatrina, COP-I y COP-II), ya que la invaginación ocurre hacia el interior del endosoma (Schöneberg et al., 2016) (**FIGURA 9**). Además, este proceso es independiente de dinamina, ya que la proteína Vps32 miembro de ESCRT, también conocida como Snf7 en *S. cerevisiae* y CHMP4 en humanos, es la encargada de producir la constricción, la escisión de las membranas y la formación de ILV de un diámetro de 25 nm en levaduras y 50 nm en mamíferos (Babst et al., 2002; Murk et al., 2002). Por lo tanto, el proceso de escisión de la membrana es llevado a cabo íntegramente por ESCRT y, principalmente, por Vps32.

En suma, la biogénesis de los MVB y la degradación de las proteínas ubiquitinadas en el lisosoma, dependen directamente de la dinámica maquinaria ESCRT (Campsteijn et al., 2016; Woodman & Futter, 2008).

4.1.2.1 ESCRT: aspectos generales

En la década de 1980, los análisis genéticos llevados a cabo en levaduras identificaron mutantes que secretaban proteínas vacuolares (Bankaitis et al., 1986; Robinson et al., 1988). Estos mutantes se conocen como “Vps” por *Vacuolar Protein Sorting* y exhibieron defectos en la clasificación de las hidrolasas vacuolares. Del total de los genes analizados, 14 causaron la formación de un compartimento pre- vacuolar agrandado con acumulación de proteínas endosomales, fenotipo que fue utilizado para denominar a este conjunto de genes como “genes de clase E” (Coonrod & Stevens, 2010). Posteriormente, fue demostrado que los 14 genes codificaban proteínas miembros de los subcomplejos que componen la maquinaria ESCRT (Babst, 2011a; Babst et al., 1997, 1998, 2002; Katzmman et al., 2001), a la cual se le adjudicaron funciones celulares con un blanco molecular en común: las membranas. Tal es así

que, ha sido implicado en diversos procesos celulares como la citoquinesis, la gemación de virus de HIV, autofagia, exocitosis, la reparación de la membrana plasmática, el remodelado de la membrana nuclear, la eliminación de complejos del poro defectuosos, la formación de compartimentos donde se replica la cadena positiva de los virus, la micro y macro- autofagia (Olmos & Carlton, 2016). ESCRT, asimismo, ha sido relacionado a defectos neurodegenerativos y Cáncer (**FIGURA 9**).

ESCRT se encuentra evolutivamente conservado y, de manera general, sus proteínas han sido clasificadas en cuatro subcomplejos: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III. La dotación proteica que conforma cada subcomplejo presenta variaciones entre diferentes organismos (Leung et al., 2008). Asimismo, entre las proteínas accesorias del complejo (proteínas ESCRT-III asociadas), se destaca la ATPasa Vps4 (Morita et al., 2007) (**FIGURA 10**). De los cuatro subcomplejos, ESCRT-III es el que presenta la función más conservada y cumple la función principal y exclusiva en la remodelación y escisión de la membrana. Mientras tanto, el resto de los subcomplejos, además de reclutar a ESCRT-III, cumplen funciones generales en el transporte de membranas (Samson et al., 2008a, 2008b).

El complejo comienza su funcionamiento con la interacción de proteínas adaptadoras que se unen al complejo ESCRT-0 y ESCRT-I, lo cual facilita la interacción con el subcomplejo ESCRT-II y el proceso de curvatura de la membrana (**FIGURA 11**). Por último, se produce el reclutamiento de ESCRT-III, su activación en polímeros y el corte final de membrana. Cabe destacar que, si bien todo el proceso de reclutamiento es secuencial, la activación de un subcomplejo u otro depende del proceso celular llevado a cabo y del organismo en cuestión. Sin embargo, siempre es requerido y activado ESCRT-III ya que constituye el efector final del complejo total.

A continuación, se describirá la naturaleza de cada uno de los subcomplejos.

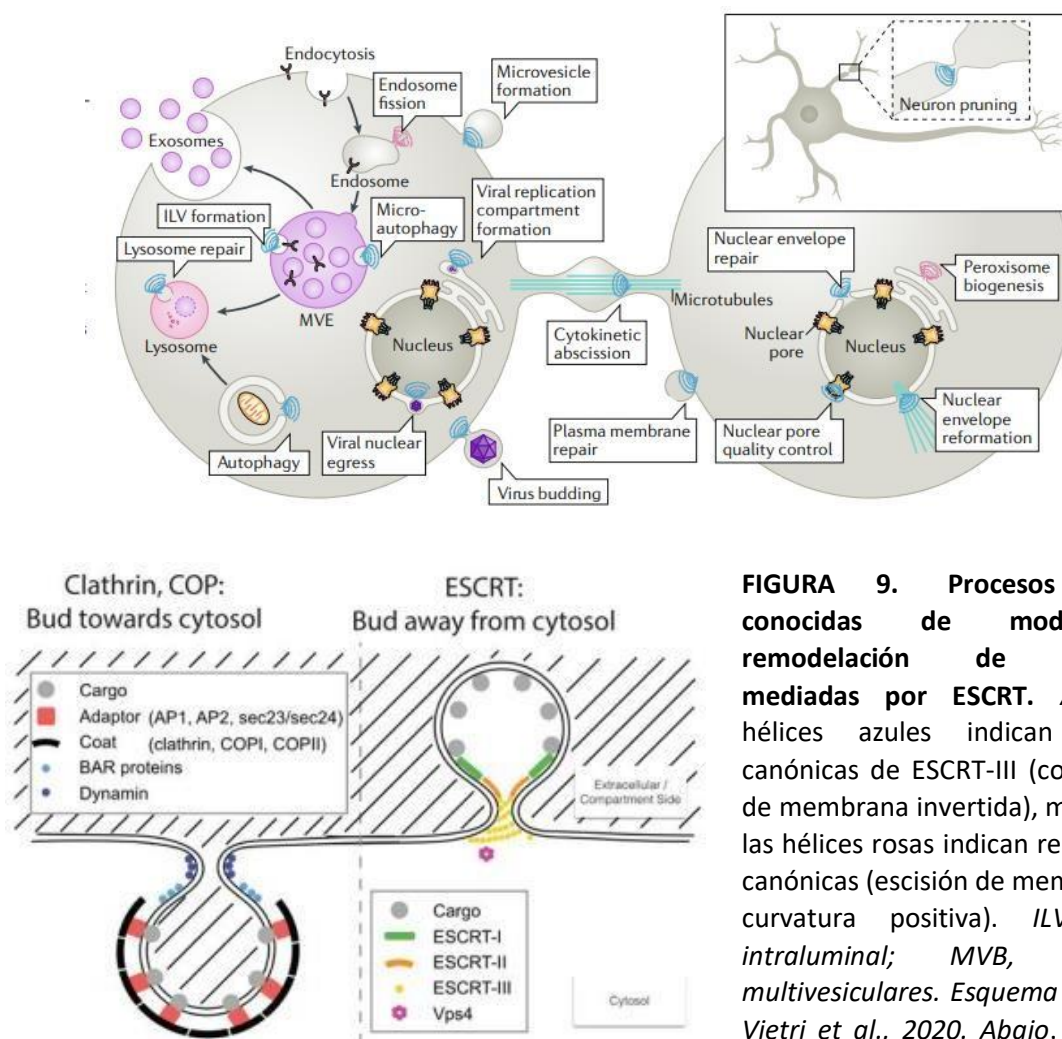
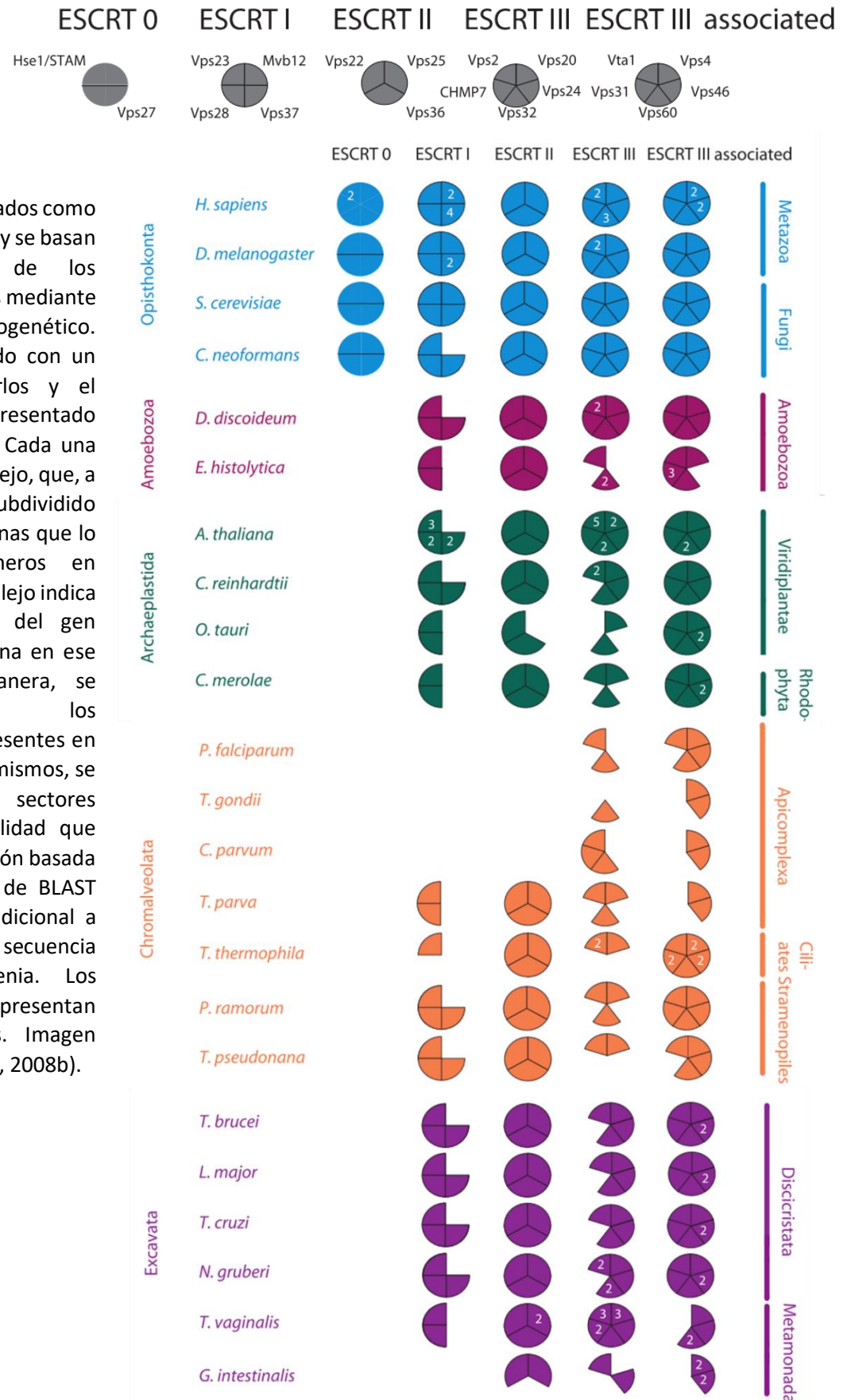


FIGURA 9. Procesos celulares conocidas de modelado y remodelación de membrana mediadas por ESCRT. Arriba. Las hélices azules indican funciones canónicas de ESCRT-III (con topología de membrana invertida), mientras que las hélices rosas indican reacciones no canónicas (escisión de membranas con curvatura positiva). ILV, vesícula intraluminal; MVB, endosomas multivesiculares. Esquema extraído de Vietri et al., 2020. Abajo. Escisión de membrana de topología “Normal” y

“reversa”. La escisión normal se lleva a cabo con un mecanismo similar al de la biogénesis de vesículas de clatrina, mientras que la escisión reversa llevada a cabo por ESCRT se produce alejada del citosol. Es notable que surge una diferencia fundamental debido a que sólo el lado de la membrana citosólica es accesible para el andamiaje de las proteínas y la maquinaria. Esquema extraído de (Schöneberg et al., 2016).

FIGURA 10.**Distribución de los componentes ESCRT a lo largo del taxón eucariota.**

Los datos son representados como un diagrama de *Coulson* y se basan en los resultados de los alineamientos obtenidos mediante BLAST y un análisis filogenético. Cada taxon es coloreado con un color para diferenciarlos y el complejo ESCRT es representado en diagrama de tortas. Cada una representa un subcomplejo, que, a su vez, se encuentra subdividido en función de las proteínas que lo conforman. Los números en blanco de cada subcomplejo indica el número de copias del gen codificante de la proteína en ese genoma. De esta manera, se puede evidenciar los componentes ESCRT presentes en cada organismo. En los mismos, se pueden observar sectores coloreados en su totalidad que derivan de la identificación basada en un resultado claro de BLAST inverso y/o evidencia adicional a través del análisis de la secuencia por CLUSTAL o filogenia. Los sectores en blanco representan datos no encontrados. Imagen extraída de (Leung et al., 2008b).



A. ESCRT-0

ESCRT-0 actúa como el primer paso de reclutamiento en la maquinaria durante la degradación de proteínas por la vía endocítica, sin embargo, durante la citocinesis ESCRT-0 no desempeña un papel relevante. ESCRT-0 posee un rol bien definido en la vía endosomal, específicamente en la clasificación de proteínas ubiquitinadas para su inclusión en vesículas intraluminales (ILV) dentro de los cuerpos multivesiculares (MVB), que luego son transportados hacia los lisosomas para su degradación. Este subcomplejo consiste en un heterodímero de dos proteínas que recluta la carga ubiquitinada. En humanos consiste en Hrs (*Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) y STAM (*Signal Transducing Adaptor Molecule*); mientras que en levaduras consiste en Vps27 y Hse1. Hrs presenta un dominio de unión a la carga ubiquitinada conocida como DUIM (*double-sided ubiquitin-interacting motif*) al tiempo que posee un dominio FYVE, denominado así porque fue encontrado en cuatro proteínas ricas en cisteína: Fab 1 (*yeast orthologue of PIKfyve*), YOTB, Vac 1 (*vesicle transport protein*), y EEA1. Este dominio interactúa con el lípido endosómico fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) (Wollert & Hurley, 2010). A través de esta interacción, la proteína Hrs se asocia con los endosomas tempranos.

Por su parte, STAM contiene el dominio de unión a ubiquitina (UIM-ubiquitin-binding), el dominios VHS y un dominio SH3 que recluta enzimas desubiquitinizantes (Hirano et al., 2006; McCullough et al., 2006; Mizuno et al., 2003; Ren & Hurley, 2010; Row et al., 2006). Por lo tanto, Hrs y STAM reconocen la carga en los endosomas tempranos a través de los motivos de unión a la ubiquitina al tiempo que, Hrs recluta redes planas de clatrina en los endosomas generando subdominios discretos reclutadores de otros componentes de la maquinaria que promueven la curvatura y escisión de la membrana (Raiborg, 2001; Raiborg et al., 2006). De manera global, ESCRT-0 funciona como marcador de la región de la membrana endosómica y actúa como un reclutador de moléculas de carga específica, conformando un dominio de clasificación de proteínas con marca de ubiquitina mientras que excluye otras proteínas de membrana (por ejemplo, que se reciclan de regreso al Golgi).

Luego, Hrs recluta a ESCRT-I por interacción directa de dominios específicos (unión de secuencia PSAP de ESCRT-0 con UEV -variante de ubiquitina E2- del complejo ESCRT-I).

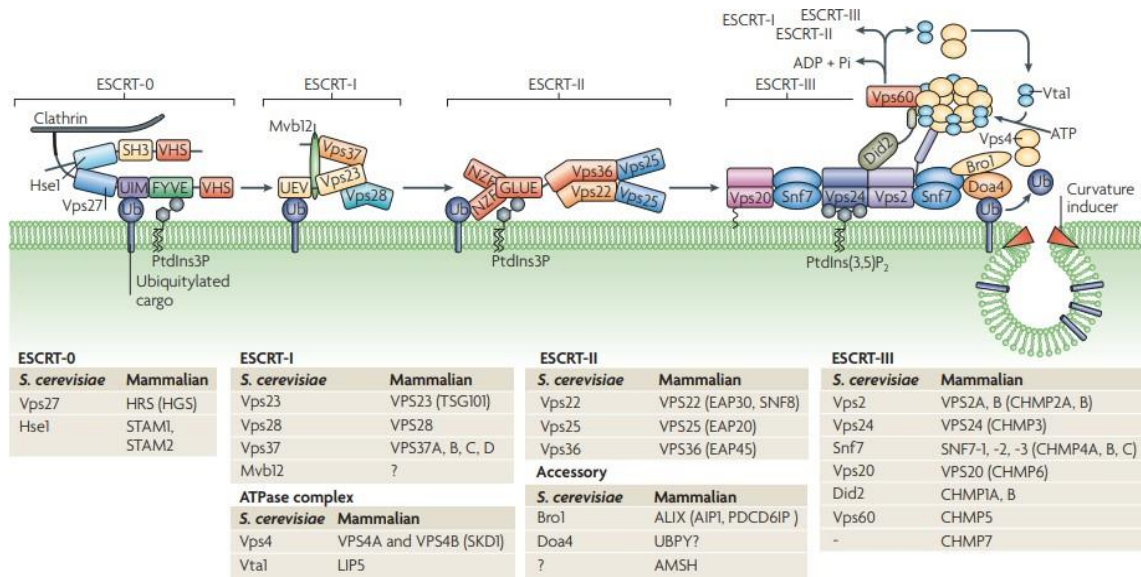


FIGURA 11. Reclutamiento secuencial general de la maquinaria ESCRT involucrada en el transporte y clasificación de proteínas desde MVB hacia lisosomas. Los subcomplejos son reclutados a los endosomas por sus interacciones con las membranas, con clatrina y ubiquitina. El reconocimiento de fosfatidilinositol-3-fosfato por el dominio FYVE de Vps37 (ESCRT-0) o por el dominio GLUE de Vps36 (ESCRT-II), o fosfatidilinositol-3,5-bisfosfato (PtdIns(3,5)P₂) por Vps24 (ESCRT-III) podría contribuir con la localización de los componentes en endosomas tempranos o tardíos. Excepto por ESCRT-III, los subcomplejos restantes reconocen y se unen a la carga ubiquitinada, ya sea a través de un motivo de interacción con la ubiquitina (UIM) (ESCRT-0), un dominio de variante E2 de ubiquitina (UEV) (ESCRT-I) o el dominio GLUE de Vps36 (ESCRT-II). ESCRT-III organiza los últimos pasos de la vía en la que la ubiquitina es eliminada por una desubiquitinasa y los complejos son desensamblados por la ATPasa Vps4. Los paneles inferiores enumeran las subunidades ESCRT y las proteínas accesorias de *S. cerevisiae* y sus homólogos de mamíferos.

AMSH, molécula asociada con el dominio SH3 de STAM; *CHMP*, proteínas de los cuerpos multivesiculares cargado (MVB); *SH3*, homología Src-3; *STAM*, molécula adaptadora transductora de señales; *UBPY*, proteasa Y específica de ubiquitina. Esquema extraído de Williams & Urbé, 2007.

B. ESCRT-I

Consiste en un heterotetrámero compuesto de las proteínas Vps23, Vps28, Vps37 y Mvb12 (Chu et al., 2006; Katzmann et al., 2001; Morita et al., 2007; Oestreich et al., 2007).

Vps23, conocida como TSG101 en humanos, interactúa con ESCRT-0 (a través del motivo PSAP) y con ubiquitina a través de un dominio UEV (variante UB E2) (Chu et al., 2006). Mientras tanto, Mvb12 establece interacciones con la ubiquitina a través de sus dominios UBD (*Ubiquitin-binding domains*) en su C-terminal. Por su parte, Vps28 presenta un dominio CTD (*C-terminal*

four-helix bundle domain) responsable de la interacción con ESCRT-II funcionando como un conector entre ESCRT-I y ESCRT-II (Gill et al., 2007).

C. ESCRT-II

Este subcomplejo consiste en un heterotetrámero conformado por dos copias de Vps25, una copia de cada Vps22 y Vps36. El extremo N- terminal de Vps36 presenta un dominio GLUE (*GRAM-Like Ubiquitin-binding en EAP45*), similar al dominio PH (dominio de homología de pleckstrina) (Teo et al., 2006), que permite la traslocación de Vps36 a los endosomas, al tiempo que sirve de unión a Vps28 (ESCRT-I). Paralelamente, contiene dos dominios NSF integrales que reconocen la ubiquitina (Teo et al., 2006). Las dos subunidades Vps25 están asociadas de manera flexible con el subcomplejo Vps22/Vps36. Ambas copias de Vps25 son esenciales para la clasificación de los MVB e interactúan físicamente con las moléculas de Vps20 (ESCRT-III). Por lo tanto, activan la polimerización de dos filamentos ESCRT-III (Henne et al., 2012). Tal como se puede apreciar hasta aquí, los subcomplejos ESCRT-I y ESCRT-II funcionan como simples recolectores de carga, no teniendo ninguna incidencia directa en la formación de las vesículas.

D. ESCRT-III

Constituye la pieza clave de la maquinaria ESCRT en sus funciones sobre las membranas. De todos los subcomplejo, ESCRT-III es el único que presenta una alta conservación evolutiva y, de hecho, es el único que posee homólogos en *Archaeas* (Leung et al., 2008b; Samson et al., 2008c, 2008a). En levaduras, ESCRT-III consiste en cuatro subunidades: Vps20, Vps32 o Snf7, Vps24 y Vps2 y, asimismo, se destacan tres proteínas accesorias conocidas como Did2, Vps60 y Ist1 (Babst et al., 2002; Nickerson et al., 2006). Estructuralmente, las proteínas miembros de ESCRT-III se caracterizan por ser proteínas de aproximadamente entre 200-250 aminoácidos y la secuencia primaria presenta variaciones entre organismos (Shim et al., 2007). La estructura secundaria se caracteriza por hélices α , de características químicas básicas y ácidas, y cuyo número varía dependiendo del organismo en cuestión (Bajorek et al., 2009; Muzioł et al., 2006). Las características ácidas y básicas de estas hélices definen regiones dentro de las

proteínas; por lo que se reconoce una región N-terminal (NTR) básica y una región C-terminal (CTR) ácida. La interacción intramolecular entre ambos extremos provoca que las proteínas del complejo se encuentren en el citosol y en una conformación espacial descripta como monómero, inactiva o cerrada. Por lo tanto, las subunidades ESCRT-III existen en el citosol como monómeros inactivos que se ensamblan transitoriamente en las membranas cuando el subcomplejo se activa (Babst et al., 2002; Saksena et al., 2009; Teis et al., 2008). Cuando esto ocurre, se produce el cese de las interacciones entre las regiones terminales, las proteínas adquieren una conformación abierta y se produce la formación de los polímeros con capacidad de asociación a las membranas (Shim et al., 2007). Debido a la alternancia de los estados conformacionales que experimenta este subcomplejo, ha sido calificado como un complejo dinámico cuya naturaleza transitoria lo hace relativamente intratable para los estudios bioquímicos y estructurales (Babst, 2011a).

En el momento en el cual ESCRT-III está activo, se produce la formación de filamentos o espirales que participan en las reacciones de deformación y escisión de la membrana. Al respecto, ha sido reportado que las subunidades ESCRT-III individuales han sido observadas formando filamentos (Vps24), anillos, hojas (Snf7) y tubos (hVps24, hVps2, hIst1, hDid2) (Bajorek et al., 2009; Ghazi-Tabatabai et al., 2008; Lata et al., 2008). Esto, como ha sido descrito anteriormente, se debe a la estructura secundaria de estas proteínas ESCRT-III, las cuales, a pesar de compartir características estructurales similares, asumen funciones distintas y no redundantes durante la remodelación de la membrana (Muzioł et al., 2006). De hecho, el evento esencial para llevar a cabo la constricción y la gemación de la membrana es el ensamblaje de los múltiples monómeros de Snf7/Vps32 en filamentos o espirales (Ghazi-Tabatabai et al., 2008). Esto ocurre cuando Snf7/Vps32 homopolimeriza o se autoensambla en contacto con la membrana. La manera en la que Snf7/Vps32 es reclutada puede variar según el proceso celular, por lo tanto, el reclutamiento de Snf7 se puede llevar a cabo posteriormente al reclutamiento de Vps20 (ESCRT-III) para la formación de MVB o la citoquinesis, o posteriormente al reclutamiento de Alix (ESCRT-II) para que actúe en la brotación de los virus desde la membranas (Morita et al., 2010).

De manera general, el ensamblaje de ESCRT-III se inicia por la interacción entre Vps20 y Vps25 (ESCRT-III), siendo Vps20 la proteína que nuclea al polímero Vps32/Snf7. Aunque no se conoce la estequiometría precisa, la evidencia indica que Vps32 es el componente principal del filamento y es al menos diez veces más abundante que Vps20. En el otro extremo, el polímero de Snf7 es cubierto por Vps24 que también recluta a Vps2 (ambos miembros de ESCRT-III). Finalmente, Vps2 recluta a la ATPasa Vps4, la cual genera el reciclaje del complejo al citosol (Babst et al., 1998) y, por otro lado, aporta la energía necesaria para generar el corte de la membrana. Esto último depende de su asociación con Snf7/Vps32 (Babst et al., 1997, 1998; Muzioł et al., 2006; Nickerson et al., 2006; Obita et al., 2007; Shestakova et al., 2010; B. Yang et al., 2015).

Las subunidades accesorias de ESCRT-III, Did2 e Ist1 no son estrictamente necesarias para la clasificación en los MVB, pero contribuyen en gran medida a la eficiencia del proceso. El papel de la proteína accesoria ESCRT-III Vps60/CHMP5 durante la clasificación de carga de MVB no está definido, pero al parecer, simula la actividad de la ATPasa Vps4 (Nickerson et al., 2006).

5. Tráfico intracelular de proteínas en tripanosomátidos

5.1 Aspectos biológicos de los Tripanosomátidos.

Ya teniendo conocimiento de la complejidad de los ciclos de vida de estos organismos, este apartado estará destinado a la descripción de las estructuras generales y comunes presentes en los tripanosomátidos (**FIGURA 12**), para luego describir en detalle las estructuras específicas involucradas en el tráfico vesicular.

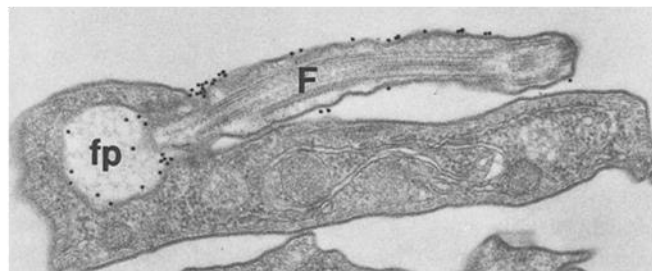
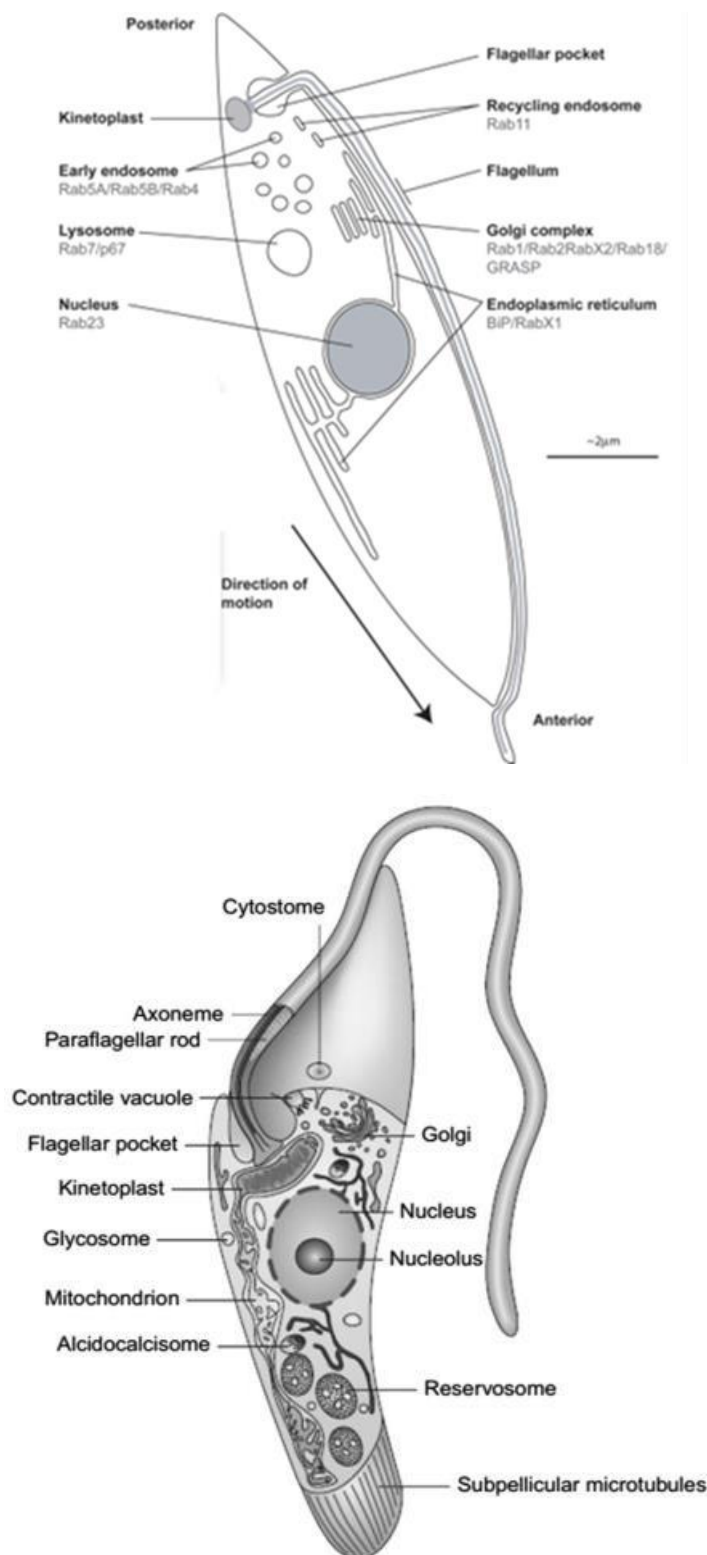


FIGURA 12. Arquitectura celular general de Tripanosomátidos. Arriba Izquierda. Célula de *T. brucei* estadio procíclico (PCF) resaltando la posición de varias organelas intracelulares y sus proteínas asociadas. La célula fusiforme mide aproximadamente 15 µm x 4 µm y la mayor parte de la vía de

transporte de la membrana se limita a la parte posterior de la célula Field et al., 2004; Field & Carrington, 2004. **Arriba derecha.** Imagen de *T. brucei* BSF que demuestra cómo el flagelo emerge del bolsillo flagelar (FP). Los cultivos fueron incubados por 5 min a 37°C con conjugados de transferrina-oro los cuales pueden apreciarse en el bolsillo flagelar (de Souza et al., 2009). **Abajo.** Representación esquemática de la sección longitudinal de un epimastigote de *T. cruzi* que muestra las principales estructuras y orgánulos encontrados (Souza et al., 2017).

Estructuras generales

Los tripanosomátidos son protistas uniflagelados que pertenecen al orden taxonómico Kinetoplastidae, caracterizado por presentar ADN mitocondrial (kDNA) organizado en una estructura llamada kinetoplasto (Simpson, 1986). La estructura molecular del kinetoplasto consiste en un arreglo complejo de fibras de ADN circular fuertemente compactado y entrelazado que se ubica dentro de la matriz del mitocondrion, una estructura de gran tamaño que se extiende por todo el cuerpo celular y que cumple las funciones de la única mitocondria en estos organismos. El kDNA se encuentra asociado a proteínas que participan en distintos procesos propios del kinetoplasto (enzimas como la topoisomerasa tipo II, la DNA polimerasa, la proteína de unión al origen de minicírculo, proteínas condensadoras del kDNA, proteínas asociadas a kinetoplasto, una *nicking enzyme*, proteínas *heat shock* mitocondriales y un grupo de proteínas de unión al kinetoplasto) (Zuma et al., 2020). Dos tipos de subestructuras pueden ser identificadas en el kinetoplasto: los minicírculos y los maxicírculos, cuya cantidad y longitud, son rasgos exclusivos de cada especie de Kinetoplástico (Klingbeil & Englund, 2004). Asimismo, los tripanosomátidos se caracterizan por poseer un único flagelo, el cual cumple funciones en el movimiento, la coordinación de la citoquinesis y funciona como un orgánulo sensorial (Langousis & Hill, 2014). El mismo nace del cuerpo basal, una estructura cilíndrica compuesta por microtúbulos cuya función es homóloga a la del centriolo de las células animales, de manera que es fundamental para el ensamblaje, el anclaje y la orientación del flagelo. Finalmente, este emerge a través de una invaginación de la membrana plasmática, una región especializada de gran importancia estructural y metabólica denominada bolsillo flagelar o *Flagellar Pocket* (FP), el cual se describirá a la brevedad (Halliday et al., 2021). Por su parte, el cuerpo basal se encuentra en conexión con el kinetoplasto a través de filamentos citoesqueléticos conformando un sistema conocido como el *Flagellum Attachment Zone* (FAZ), el cual se describirá al abordar las características del flagelo. El vínculo entre ambas

estructuras asegura que el kinetoplasto sea segregado adecuadamente durante la división celular, ya que el movimiento del cuerpo basal guía su separación.

Por otro lado, el RE se extiende por toda la longitud del cuerpo celular generando conexiones en forma de tubo con FAZ (Vickerman, 1969). En estos organismos también se distingue el glicosoma, una organela emparentada con los peroxisomas, de estructura esférica y matriz homogénea, que se encuentra esparcida en forma aleatoria por toda la célula (Souza, 2009; Zuma et al., 2020). Y otro componente vacuolar localizado por todo el citoplasma de los tripanosomátidos es una estructura electrón-densa denominada acidocalcisoma, el cual contiene transportadores y bombas iónicas en sus membranas, como las ATPasas de tipo vacuolar ($V\text{-H}^+\text{-ATPasa}$) (Miranda et al., 2000; Zuma et al., 2020). Estas organelas actúan como reservorios de calcio, sodio, potasio, zinc, hierro y compuestos fosfóricos y también se encuentran involucrados en la homeostasis del pH celular y la osmorregulación, proceso en íntima asociación con la vacuola contráctil, además de desempeñar un papel en la respuesta a condiciones de estrés y en la diferenciación celular del parásito (Miranda et al., 2000). Por su parte, el complejo de Golgi consiste en complejos vesiculares, con caras *cis* y *trans* y ambos complejos de coatómeros COP-I y COP-II (Jeffries et al., 2002; Maier et al., 2001; Warren, 2013).

5.1.1 Mantenimiento de la arquitectura celular de los tripanosomátidos

Corset subpelicular, Flagelo y transporte vesicular.

La forma de las células del tripanosoma resulta del arreglo de la matriz o corset subpelicular, compuesto de microtúbulos interconectados que subyace por debajo de la membrana plasmática, de manera similar a una armadura. Los microtúbulos que componen este corset se encuentran regularmente espaciados e interconectados entre sí (Sinclair et al., 2021) **(FIGURA 13)**. Esta disposición en la que los microtúbulos del *corset* muestran una longitud variable y una disposición de continuidad con los que se encuentran inmediatamente adyacentes, genera un entramado con un patrón de interdigitación que permiten los cambios morfológicos (principalmente longitud de las células) sin que se produzcan regiones débiles. Simultáneamente, los microtúbulos del corset se encuentran conectados con la membrana

plasmática confiriendo rigidez y flexibilidad a la célula. De hecho, esta interacción también proporciona resistencia frente a tensiones mecánicas y fuerzas que el parásito puede experimentar, especialmente durante su tránsito a través de tejidos del hospedador o durante la división celular. La adhesión de la membrana plasmática al corset se lleva a cabo a través de las proteínas de anclaje que conectan la red de microtúbulos con la capa lipídica de la membrana. Por lo tanto, las proteínas de anclaje aseguran que la forma del parásito se mantenga constante y que el tráfico vesicular se organice o restrinja a una determinada región (Gull, 1999). Algunas de las proteínas de anclaje más relevantes son *Paraflagellar Rod* (PFR), las kinesinas, las dineínas y las proteínas con dominios CH (Field & Carrington, 2009). Asimismo, las proteínas kinesinas y dineínas, motores moleculares que se desplazan a lo largo de los microtúbulos, también contribuyen indirectamente a la organización y conexión de los microtúbulos con otros elementos del citoesqueleto y la membrana plasmática, favoreciendo la estabilidad de la estructura subpelicular (Hertz-Fowler et al., 2001; Olego-Fernandez et al., 2009).

Los microtúbulos que forman el corset subpelicular están constituido por dímeros de α -tubulina y β -tubulina que se ensamblan en estructuras tubulares dispuestas longitudinalmente a lo largo del cuerpo del parásito, desde la región anterior hacia la posterior. La disposición de estos microtúbulos crea un espacio limitado para el transporte de vesículas, influyendo en la dirección y la eficiencia hacia regiones específicas de la membrana plasmática. Por lo tanto, el corset posee una gran incidencia en la regulación del tráfico vesicular optimizando procesos de reciclaje de membrana y la exocitosis de moléculas de superficie, tal como las glicoproteínas de superficie variable (VSG). Además de determinar la forma celular, el corset subpelicular influye en la forma y estabilidad del bolsillo flagelar al tiempo que modula los mecanismos de transporte vesicular. Y, de hecho, conjuntamente el corset y la luz del bolsillo modulan el transporte vesicular que se desarrolla dentro del flagelo (Absalon et al., 2008; Qin et al., 2004).

Otro aspecto importante del corset, es que, durante la división celular, su disposición sufre adaptaciones para permitir la duplicación (**FIGURA 13**). El corset subpelicular se mantiene

intacto, pero nuevos microtúbulos se agregan y se intercalan con los ya existentes para que cada célula hija reciba el número exacto de microtúbulos que conforman esta estructura. Entonces, para el momento en que la célula se divide, un corset completo es heredado en forma semiconservativa durante la citoquinesis (Gull, 1999; Vaughan & Gull, 2008). Por lo tanto, los cambios morfológicos entre las diversas formas de desarrollo, el crecimiento y la remodelación del citoesqueleto en la división celular se ven garantizados gracias a la naturaleza del corset subpelicular.

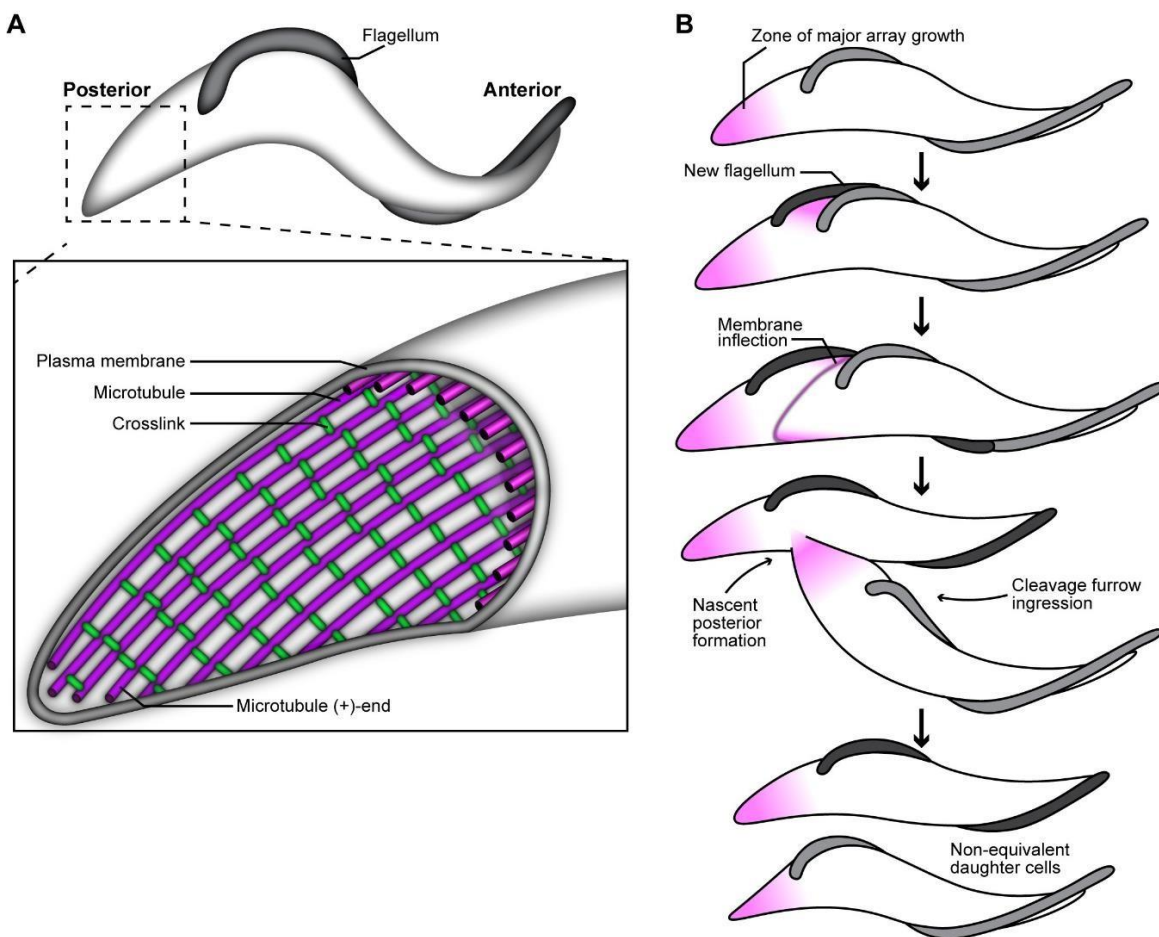


FIGURA 13. Esquema del citoesqueleto y la división celular en *T. brucei*. **A.** La matriz subpelicular consiste en una sola capa de microtúbulos (morado) que subyace a la membrana plasmática. Los microtúbulos se encuentran entrelazados entre sí por fibrillas regularmente espaciadas (verde). Los extremos positivos en crecimiento de los microtúbulos de la matriz miran hacia la parte posterior de la célula. **B.** Los microtúbulos de la matriz parecen polimerizarse de forma constante en el extremo posterior de la célula (sombreado morado). A medida que se nuclea el nuevo flagelo, se insertan nuevos microtúbulos entre el flagelo antiguo y el nuevo para aumentar la anchura celular. Se forma una inflexión de la membrana que delimita la vía de entrada del surco de segmentación, que sigue la trayectoria helicoidal de los microtúbulos de la matriz. La entrada del surco de segmentación se inicia

en la parte anterior de la célula, y la formación del extremo posterior nascente remodela la matriz en la zona media celular para dividir la matriz subpelicular en dos estructuras distintas y completar la citoquinesis. Esquema extraído de Sinclair et al., 2021.

Flagelo

El esqueleto del flagelo está formado por un axonema, compuesta de una estructura típica de nueve dobletes de microtúbulos externos rodeando a un par central (9+2) (Field & Carrington, 2009; Gull, 1999). Asimismo, el axonema asociado con *Paraflagellar rod* (PFR) se encuentra dentro de la membrana flagelar. El flagelo se origina dentro del cuerpo celular a partir del cuerpo basal, que lo conecta físicamente al ADN kinetoplasto (kDNA) y al cuerpo pre-basal a través del complejo de unión tripartito (TAC) (Ogbadoyi et al., 2003; D. Robinson & Gull, 1991) **(FIGURA 14)**. Durante la división celular, a medida que el cuerpo basal del flagelo se duplica y se separa, el TAC asegura que una copia del kinetoplasto se mueva en conjunto con el nuevo cuerpo basal. Ya que la replicación y la división del kinetoplasto y el núcleo son eventos separados dentro de la división celular, la importancia del TAC radica en la coordinación y sincronización de la división celular.

El flagelo emerge de la célula a través del bolsillo flagelar, región carente de microtúbulos subpeliculares (Allen et al., 2003; Field & Carrington, 2009) y en el punto de salida del flagelo, el collar del bolsillo flagelar tensa el alrededor de la membrana flagelar (Bonhivers et al., 2008; Kelly et al., 2020) **(FIGURA 14)**.

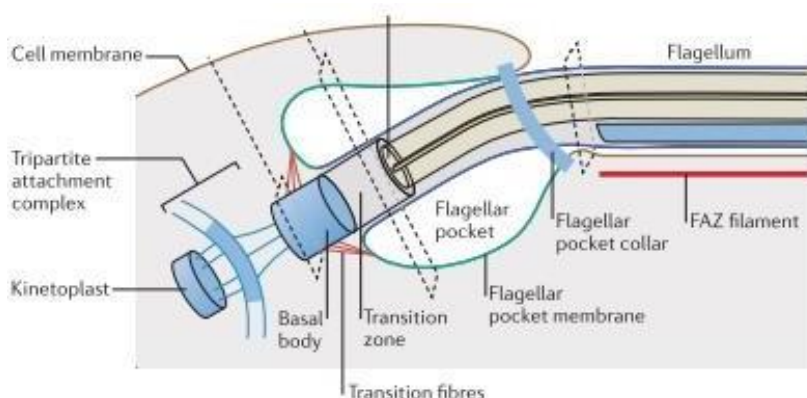


FIGURA 14.
Complejo de unión tripartita. Posiciones del bolsillo flagelar, el flagelo, el núcleo y el kinetoplasto compuesto por su ADN (kDNA) (Kelly et al., 2020).

La forma e integridad del parásito depende del citoesqueleto o corset subpelicular, del

Microtubule Quartet (MtQ) y el axonema flagelar (Lacomble et al., 2009) (**FIGURA 15**). Los cuatro microtúbulos citoplasmáticos (MtQ) se encuentran del lado del cuerpo celular con una polaridad opuesta a la de los microtúbulos subpelliculares y nacen del espacio comprendido entre el cuerpo basal y el pre-cuerpo basal y se dispone a lo largo del FAZ. El pre-cuerpo basal es estructuralmente idéntico al cuerpo basal y da origen al nuevo flagelo al comienzo de la división celular (Lacomble et al., 2009; Sunter & Gull, 2016). Asimismo, el flagelo corre a lo largo del cuerpo celular en forma de espiral hacia el polo anterior de la célula y se mantiene unido al cuerpo celular por el *Flagellum Attachment Zone* (FAZ) a través de uniones transmembrana que generan una especie de costura de interconexión entre cuerpo celular-flagelo (Lacomble et al., 2009; Sunter & Gull, 2016) (**FIGURA 16**). La función y la estabilidad de FAZ es esencial para la viabilidad de los tripanosomátidos, ya que se han demostrado que las alteraciones en las proteínas que componen FAZ pueden llevar a defectos en la morfología celular y a problemas durante la división celular, afectando la proliferación del parásito (Sunter et al., 2015). También influye en el tráfico vesicular, dado que la orientación del flagelo afecta la disposición de las organelas y las vesículas durante la formación de las nuevas células (Albisetti et al., 2023).

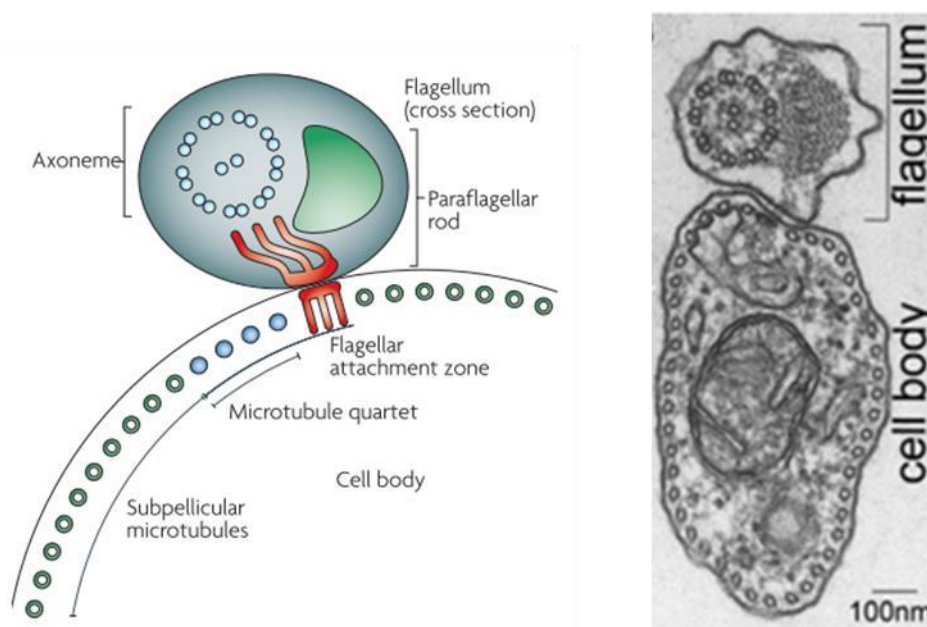


FIGURA 15. Derecha. Sección transversal de la micrografía electrónica de transmisión que ilustra el flagelo adherido y los microtúbulos subpelliculares subyacentes a la membrana plasmática del cuerpo celular (Gull, 1999). Izquierda. Estructura citoesquelética de parásitos procíclicos. Sección transversal

de la célula que muestra la distribución de los microtúbulos en la matriz subpelicular, los microtúbulos del axonema del flagelo, Paraflagellar Rod (PRF) y la zona de unión al flagelo. La polaridad de los microtúbulos del axonema y el cuarteto de microtúbulos (en azul) está organizada de manera que el extremo negativo está del lado del espectador y el positivo hacia el lado más alejado. Los microtúbulos restantes de la matriz subpelicular presentan la polaridad opuesta (Field & Carrington, 2009).

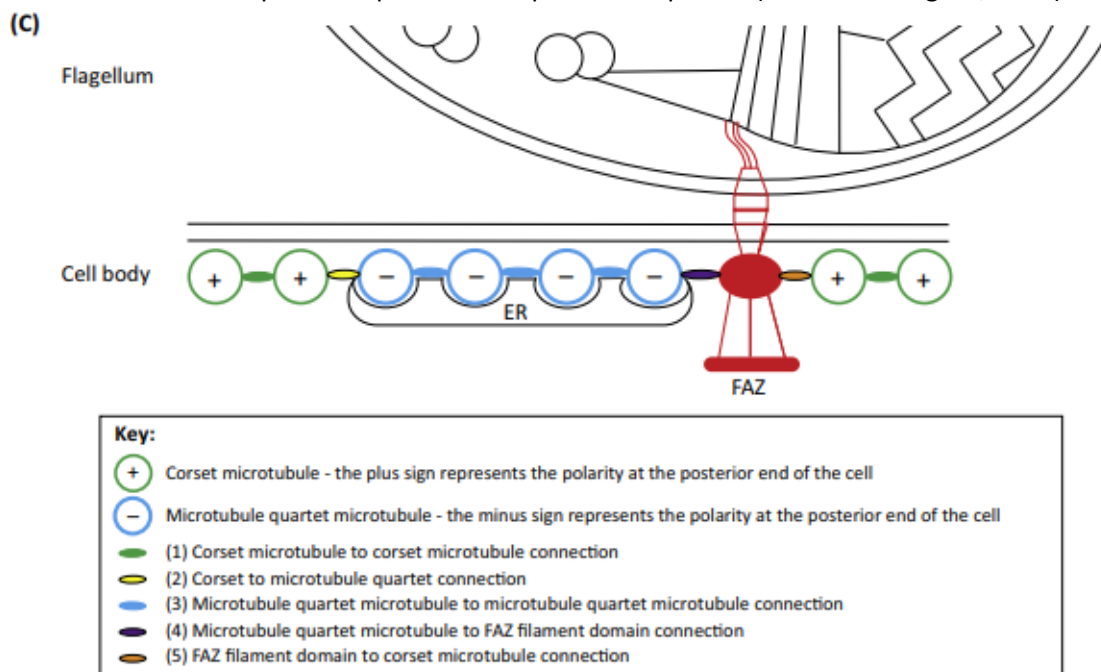


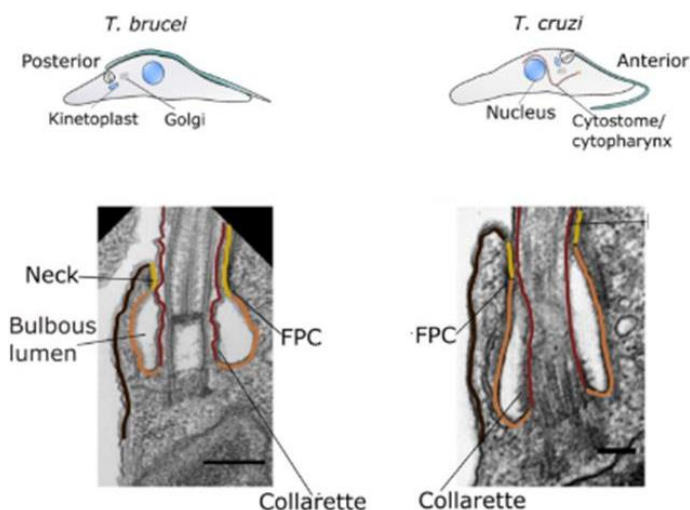
FIGURA 16. Dibujo de la sección transversal que resalta la costura asimétrica generada en los microtúbulos del corset por FAZ y el MTQ. Se muestran las cinco conexiones diferentes entre los diversos componentes (Sunter & Gull, 2016).

Bolsillo Flagelar (FP)

El bolsillo flagelar estructuralmente consiste en una pequeña porción desprovista de microtúbulos donde se produce todo el intercambio de nutrientes y moléculas entre el parásito y su medio externo, pero también es la región por la que emerge el flagelo (**FIGURA 14**). El bolsillo flagelar posee límites bien definidos, de manera que el límite proximal del bolsillo flagelar está dado por el cuerpo basal, mientras que el distal está definido por la región del cuello. En la región distal, se reconoce el collar o *Flagellar Pocket Collar* (FPC), una estructura proteica electrón densa que rodea el flagelo en el punto donde emerge del bolsillo flagelar (**FIGURA 14 y 17**). El FPC consiste en un sitio de constricción donde confluyen la membrana plasmática, la membrana flagelar y del bolsillo flagelar y mantiene la continuidad estructural entre el flagelo y la célula garantizando el correcto posicionamiento del flagelo, la correcta biogénesis de este y, en consecuencia, la correcta morfología del bolsillo flagelar

(Field & Carrington, 2009; Fridberg et al., 2007; Halliday et al., 2021; Smallridge, 2008).

A



B

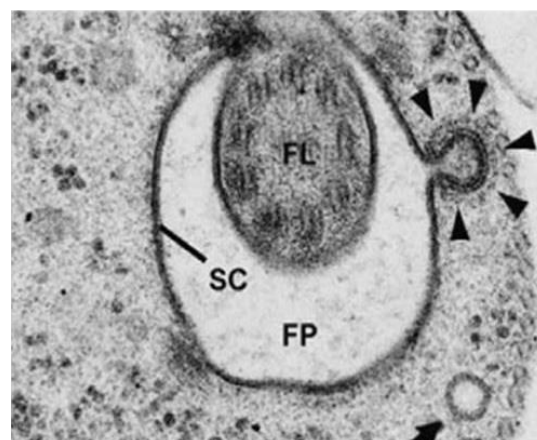


FIGURA 17. Arquitectura del bolsillo flagelar de los tripanosomátidos. A. Diagramas de las morfologías de *T. brucei* PCF y *T. cruzi* epimastigote presentes en el intestino medio de sus respectivos insectos vectores, donde se muestra la posición de los núcleos, el kinetoplasto y los bolsillos flagelares. B. Micrografías electrónicas de transmisión de cortes delgados representativas de los bolsillos flagelares de *T. brucei* y *T. cruzi*. Se resaltan los diferentes dominios de la membrana, con el *collarete* y el FPC marcados. La barra de escala es de 300 nm (Halliday et al., 2021). B. El bolsillo flagelar es la región donde se produce la endocitosis y exocitosis. En la imagen, el bolsillo flagelar está recubierto por una capa superficial de VSG (SC), la cual fue internalizada en fosas recubiertas de clatrina (punta de flecha) formando vesículas endocíticas típicas (flechas). Las mismas contienen VSG en su lado luminal (de Souza et al., 2009).

El *collarete* es un subdominio específico dentro del bolsillo flagelar por el cual el flagelo se ancla a la membrana plasmática y se encuentra próximo al cuerpo basal (**FIGURA 17A**). Tal como se ha descrito, el bolsillo flagelar es la región donde se concentra el transporte de moléculas vía endocitosis o exocitosis (**FIGURA 17B**) pero, además, organiza el transporte intraflagelar (IFT). El IFT consiste en el movimiento bidireccional de partículas proteicas a lo largo de los microtúbulos axonemales, los cuales son necesarios para el ensamblaje y mantenimiento de los flagelos y cilios eucariotas. Entonces, a pesar de su aparente estabilidad, el flagelo es una estructura dinámica en la que los microtúbulos y las proteínas anexas se renuevan constantemente. Es decir, el ensamblaje y desensamblaje continuo de los componentes axonemales en la punta del flagelo requiere el suministro perpetuo de

precursores a la punta, como así también, la eliminación de las proteínas flagelares removidas. Por lo tanto, todos los polipéptidos que forman el axonema deben transportarse a la punta flagelar para su ensamblaje, no sólo para el crecimiento flagelar, sino también para el mantenimiento de la longitud completa del flagelo maduro. Al respecto, se ha reportado que la ausencia del IFT en las células, provoca que los flagelos no puedan ensamblarse, e incluso que los flagelos existentes se acorten gradualmente por la incapacidad de reponer las subunidades en la punta del axonema (Marshall & Rosenbaum, 2001).

El bolsillo flagelar organiza y modula el transporte vesicular no sólo por su arquitectura sino también por su composición. En esta región se sitúan microdominios importantes para la endocitosis de macromoléculas y la regulación del transporte, compuestos por fosfolípidos como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos y colesterol, que confieren fluidez y flexibilidad. Adicionalmente, la luz del bolsillo flagelar está compuesta por una matriz rica en carbohidratos de composición poco definida y de funcionalidad desconocida y los diferentes elementos que la componen interactúan de manera coordinada para mantener la homeostasis celular y la adaptabilidad del parásito (Field & Carrington, 2009). En suma, el bolsillo flagelar, una región limitada y de alta actividad metabólica, facilita el control espacial de la entrada y salida de macromoléculas. Su especialización permite la regulación eficiente del transporte vesicular: la endocitosis de nutrientes, la exocitosis de moléculas de superficie y el IFT.

5.1.2 Membrana plasmática y transporte vesicular.

En los mamíferos, numerosas proteínas presentan una modificación postraduccional especial que consiste en la adición de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI), el cual fija la proteína madura a la superficie extracelular de la membrana (Lakhan et al., 2009). Estas proteínas cumplen funciones de receptores celulares, clasifican las proteínas que deben madurar y protegen a la célula de las agresiones externas (Lakhan et al., 2009; Watanabe et al., 2007). Las superficies celulares de los tres tripanosomátidos de mayor relevancia clínica, *Leishmania major*, *T. cruzi* y *T. brucei* están compuestas principalmente por estas proteínas con GPI (Field et al., 2007) y su relevancia en estos tripanosomátidos se dimensiona al tener en cuenta que,

mientras en las células de mamíferos la dotación de proteínas con anclaje GPI representa sólo el 0,5% del contenido proteico, en los tripanosomátidos representa casi el 10%; es decir, 20 veces más (Overath & Engstler, 2004). En estos organismos, debido a que el transporte vesicular se encuentra restringido al bolsillo flagelar y a esta gran concentración de proteínas con anclaje GPI en la superficie, los sistemas de transporte son más especializados y con una dinámica más compleja. De hecho, se ha reportado que la dinámica del transporte es exacerbada cuando se exhibe una gran dotación de proteínas con anclaje GPI en la superficie celular (Overath & Engstler, 2004). En este punto, es importante destacar que la dotación proteica de estas proteínas no sólo difiere entre especies de tripanosomas, sino que incluso en los diferentes estadios de vida de un mismo organismo. Por lo tanto, la dinámica del transporte se encuentra más activa en estos organismos, al tiempo que se desarrolla de una manera diferencial para cada organismo y para cada estadio celular.

En tripanosomátidos, las proteínas que se adosan a la membrana mediante GPI varían desde glicolípidos pequeños (GIPL), pasando por glicoconjugados (LPG) hasta glicoproteínas verdaderas (VSG, gp63, mucinas) (**FIGURA 18**). Al respecto, tal como en eucariotas superiores, estas proteínas son secuestradas, transportadas y clasificadas en compartimentos subcelulares específicos de los sistemas endocíticos y/o exocíticos (Pal et al., 2002).

La superficie celular del estadio sanguíneo (*bloodstream* o BSF) de *T. brucei* está compuesta por proteínas homodiméricas que presentan dos anclajes GPI, las cuales son principalmente glicoproteínas variables de superficie (VSG). El recambio de VSG de la superficie celular se produce gracias al transporte endocítico (la vía reciclaje y la exocitosis) y a la variación antigénica. Esta última consiste en el cambio de la proteína VSG expresada en la superficie celular (Ferrante & Allison, 1983). Esto lo logra mediante recombinación homóloga, la recombinación no homóloga y el reordenamiento de los loci de VSG. Estos recambios de proteínas que se suceden gracias a la acción conjunta de ambos procesos celulares, es una de las estrategias llevadas a cabo por este organismo con el objetivo de protegerse de la vía alternativa de activación del complemento y del reconocimiento general del sistema inmune del huésped.

Por su parte, *T. brucei* PCF, posee una superficie celular provista de Prociclinas, una proteína monomérica con un único anclaje GPI, que, por lo simple de su estructura, no requiere otro tipo de modificaciones postraduccionales (incluso en este estadio, la expresión de chaperonas es sumamente menor en comparación con el estadio BSF).

Por último, a diferencia de lo que se observa en *T. brucei*, en *T. cruzi*, la superficie celular está compuesta principalmente por proteínas de la familia de las mucinas O-glicosiladas y lipofosfopeptidoglicanos (LPPG) tanto en los estadios tripomastigote como amastigote (Field et al., 2007).

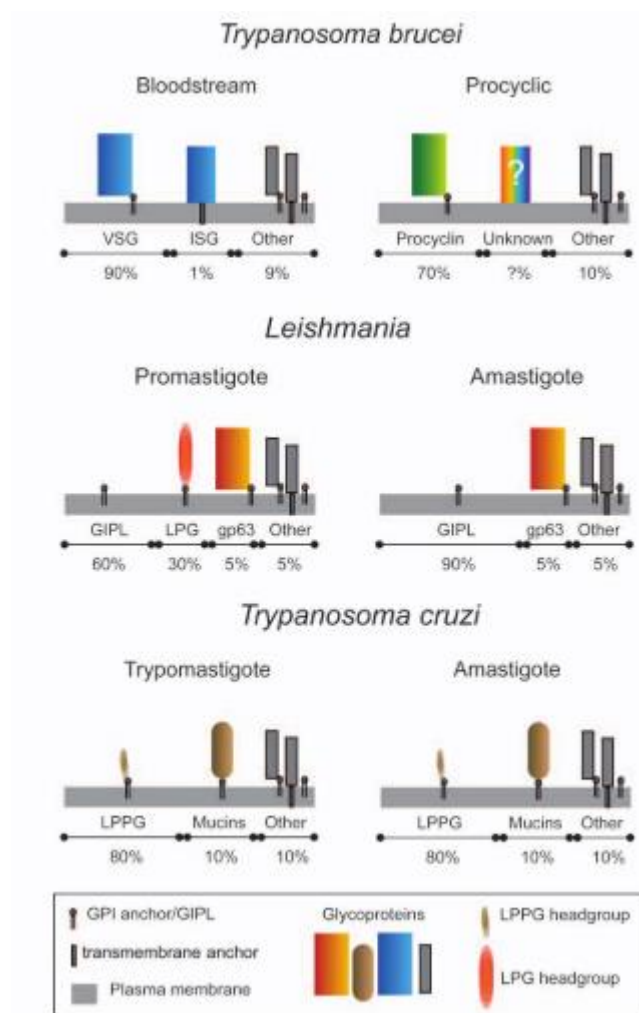


FIGURA 18. Superficie celular de los principales estadios de vida de los tripanosomátidos. Estas superficies están dominadas por antígenos anclados a GPI, hasta glicoproteínas verdaderas (VSG, gp63, mucinas). Nótese que, si bien las superficies de los dos estadios principales de *T. cruzi* parecen idénticas, la estructura de las mucinas está alterada. También se indica la proporción aproximada del antígeno de superficie total (excluyendo el fosfolípido). Desconocido o “Unknown” se refiere a una

estructura descrita recientemente en la superficie de los tripanosomas en estadio de insecto. Esquema extraído de Field et al., 2007.

5.2. Relevancia del transporte vesicular en Tripanosomátidos.

De manera general, durante la transición de un estadio parasitario a otro (insecto a mamífero y viceversa) se producen rearrreglos de la arquitectura celular, modificaciones en el transporte intracelular, modificaciones en el metabolismo primario y en la expresión génica (Field & Carrington, 2009). Estas remodelaciones forman parte de los mecanismos adaptativos aplicados por estos organismos con el objetivo de asegurar su supervivencia y garantizar una eficiente convivencia con el huésped, es decir, para continuar la progresión y persistencia de la infección.

En tripanosomátidos, respecto al tráfico vesicular, el mismo adquiere especial importancia para la comunicación con el medio externo y el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que todo el intercambio con el ambiente se restringe al bolsillo flagelar, región que comprende apenas el 5% de la superficie celular (Matthews, 2005; Overath & Engstler, 2004). Asimismo, tal como se ha mencionado, durante los diferentes estadios del ciclo de vida se expresan proteínas específicas en la superficie celular y por lo tanto la dinámica del transporte, a través del bolsillo flagelar, cambia. Todos estos cambios del transporte intracelular, que acompañan a la diferenciación parasitaria y que impactan en el sistema endocítico, responden a una estrategia de supervivencia específica. Esto último puede entenderse claramente comparando las estrategias llevadas a cabo por cada tripanosomátido. Al respecto, *Leishmania* y *T. cruzi* utilizan su sistema exocítico secretando factores líticos desde la célula. En el caso de *T. cruzi* equilibra el tráfico vesicular tanto en sus formas extracelulares, para invadir y adherirse a células hospedadoras, como intracelulares, para la degradación de nutrientes, replicación y la remodelación celular. Por el contrario, *T. brucei* pasa la mayor parte de su ciclo de vida en el torrente sanguíneo y necesita huir de la respuesta inmune del huésped, por lo que se enfoca en la constante remodelación de su capa de glicoproteínas VSG y, por lo tanto, no secreta macromoléculas en niveles detectables. La relevancia del sistema endocítico en este organismo se refleja en su capacidad de renovar todas las proteínas de su superficie celular en tan solo

12 minutos, transporte que, de hecho, se encuentra optimizado por el incremento del flujo de la vía endocítica (Overath & Engstler, 2004). En el caso de *T. brucei* PCF, el parásito en el interior de la mosca enfrenta desafíos nutricionales y osmóticos diferentes e incluso, más extremos y sus mecanismos de transporte se adaptan a esta condición (Allen et al., 2003; Matthews, 2005).

En resumen, las rutas endocíticas y exocíticas desempeñan un papel esencial en la supervivencia y adaptación de estos organismos a los distintos contextos, al compensar de manera dinámica tanto las exigencias del entorno interno y externo como a la restricción física impuesta por la exclusividad del transporte a través del bolsillo flagelar.

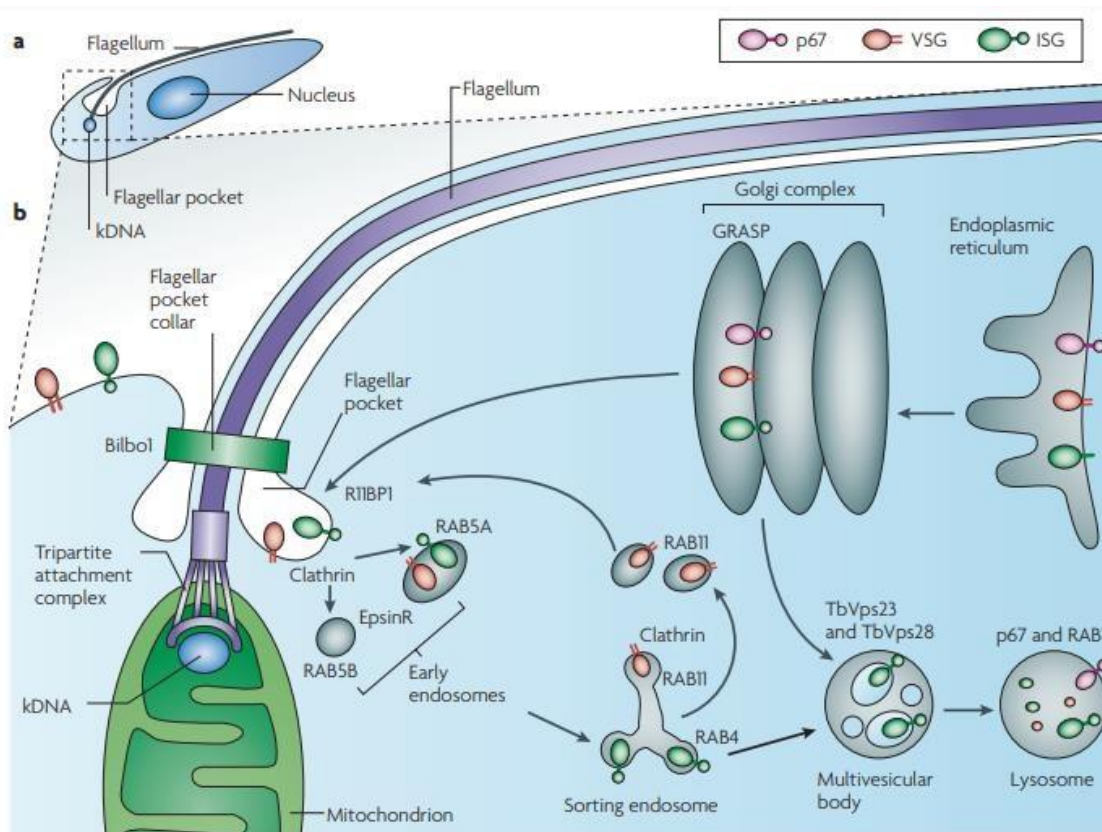


FIGURA 19. Diagrama incluye las vías de tráfico endocítico y de reciclaje entorno al bolsillo flagelar.

A. El flagelo emerge por el bolsillo flagelar y recorre todo el cuerpo celular hacia la parte anterior de la celular. **B.** El tráfico vesicular es polarizado y se concentra entre el núcleo y el kinetoplasto. En la ampliación del esquema se observan el flagelo, el bolsillo flagelar, se destacan el kinetoplasto, la mitocondria, el complejo de Golgi, el núcleo y el lisosoma. Además, se indican las proteínas Rab características de cada compartimento endocítico, y algunas proteínas tales como Vps23 y Vps28, ortólogos de los productos génicos ESCRT. Se muestran las rutas de tráfico de la glucoproteína VSG (reciclaje), la glucoproteína de superficie invariante 65 (ISG) (endocitosis) y p67, se clasifica mediante un mecanismo dependiente de la dileucina. GRASP, proteína de apilamiento y reensamblaje de Golgi.

Esquema extraído de Field & Carrington, 2009.

Tráfico vesicular en Tripanosomátidos

Aunque en general se encuentran en bajo número de copias, *T. brucei* presenta la mayoría de las organelas de la vía secretora y de la vía endocítica, es decir, retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi, lisosoma y los compartimentos endocíticos (temprano, tardío y de reciclaje) (Matthews, 2005; Overath & Engstler, 2004; Silverman et al., 2013) (**FIGURA 19**). Este sistema de endomembranas (a excepción del RE que se encuentra distribuido a lo largo del citoplasma) se encuentra dispuesto entre el núcleo y el kinetoplasto, en la parte posterior de las células formando un entramado o cisterna en forma de láminas interconectadas (Field et al., 2007; Overath & Engstler, 2004). La parte anterior de la célula se comunica con la parte posterior a través del transporte vesicular. Las vesículas que median este transporte se generan mediante un mecanismo dependiente de clatrina. Respecto a la adaptina, aún no ha sido dilucidada la localización y la función específica de los complejos de los que son parte (Allen et al., 2003). Sin embargo, en *T. brucei* y *T. cruzi*, se ha reportado que la adaptina forma complejos adaptadores (AP), similares a los de los eucariotas superiores, que participan en la regulación del transporte y son esenciales para la biogénesis vesicular, la progresión del ciclo celular y la correcta morfología celular (Field & Carrington, 2009).

5.2.1 Endocitosis en *Trypanosoma brucei*

En tripanosomátidos, la vía endocítica desde el bolsillo flagelar y la vía biosintética desde el aparato de Golgi se desarrollan hacia el lisosoma. Este es similar a una vacuola y presenta la glicoproteína transmembrana tipo I, p67, y el ortólogo catepsina-L soluble, TbCatL. Durante el mecanismo general de la vía endocítica, la carga es internalizada y transportada por vesículas recubiertas de clatrina ya que, a diferencia de los eucariotas superiores, en estos organismos la endocitosis de fase fluida y la endocitosis mediada por receptor dependen de la misma (Allen et al., 2003; Grünfelder et al., 2002; Overath & Engstler, 2004). Desde el endosoma temprano, esta carga puede ser reciclada a la superficie celular ya sea directamente a través del endosoma de reciclaje o pasando primero a través del endosoma tardío y luego al

endosoma de reciclaje (**FIGURA 19**). Puede ocurrir, también, que la carga en el endosoma temprano pueda entregarse al lisosoma pasando primero por los endosomas tardíos. El endosoma tardío ha sido descrito como una colección de estructuras membranosas complejas muy próximas al lisosoma, pero no semejantes a un MVB "clásico" (Engstler et al., 2004; Silverman et al., 2013). En estos organismos, se ha descrito que la carencia de evidencia morfológica de MVB puede deberse a la naturaleza frágil de los ILVs frente a los procedimientos estándar de fijación para microscopia electrónica o, simplemente, a que no existiesen estas estructuras en la realidad (Silverman et al., 2013). Sin embargo, en *T. cruzi* se han identificado MVB desde los cuales son secretadas vesículas extracelulares (EV). Asimismo, la evidencia también sugiere que existen funcionalidades MVB en los tripanosomas ya que el genoma de *T. brucei* codifica ortólogos para muchos componentes de la maquinaria ESCRT (Leung et al., 2008; Silverman et al., 2013). En relación a los MVB, en *T. brucei* se han caracterizado cuatro proteínas ESCRT: TbVps23, TbVps28, TbVps4 y TbVps24; las cuales han sido observadas en asociación con los endosomas tardíos. De manera general, se ha demostrado que son actores importantes en la endocitosis de proteínas ubiquitinadas vía MVB, la degradación lisosomal y el reciclaje ISG65, procesos que ocurren dentro del bolsillo flagelar (Leung et al., 2008; Silverman et al., 2013; Umaer et al., 2018; Umaer & Bangs, 2020). Esta evidencia sugiere una conexión íntima entre las proteínas ESCRT de *T. brucei*, los MVB y el bolsillo flagelar.

La ruta biosintética de *T. brucei* hacia el lisosoma es la menos conocida. Las proteínas endógenas del lisosoma, TbCatL y la glicoproteína p67, se separan de la carga secretora en el Golgi, desde donde se exportan de manera dependiente de la clatrina. Por analogía con las células de mamíferos, estas proteínas deberían clasificarse a través del endosoma tardío, pero esto no se ha demostrado formalmente en *T. brucei*.

Existe una tercera vía críptica hacia el lisosoma en los tripanosomas BSF, la ruta predeterminada, que se hace evidente cuando se interrumpen las señales normales de tráfico de proteínas endógenas (Tazeh et al., 2009).

Finalmente, en *T. brucei*, no se han identificado estructuras, microdominios o vías

dependientes de caveolina, tal como en otros eucariontes. De hecho, tampoco se han encontrado los genes codificantes. Es por ello por lo que no hay evidencia directa sobre mecanismos independientes de la clatrina a pesar de las observaciones de estructuras similares a membranas resistentes a los detergentes en tripanosomátidos (Allen et al., 2003; Denny et al., 2001).

5.2.1.1 Diferencias entre estadios parasitarios de *T. brucei*

En *T. brucei* PCF los fenómenos de endocitosis son dependientes de clatrina (Allen et al., 2003) con la participación de la dinamina (Field et al., 2007). Asimismo, en este estadio parasitario, el tráfico vesicular se adapta a los requerimientos del tracto digestivo de la mosca (Matthews, 2005). Por lo tanto, el tipo de endocitosis desarrollada en esta forma parasitaria es la endocitosis de fase fluida, adaptada especialmente al intestino del insecto vector y el torrente sanguíneo de los mamíferos. Según este mecanismo, las invaginaciones de la membrana en el bolsillo flagelar atrapan una porción del fluido extracelular, formando vesículas endocíticas que posteriormente se dirigen a los endosomas tempranos. En todo este proceso, se reconocen y transportan las proteínas de superficie necesarias para la adherencia del parásito a las células epiteliales del intestino de la mosca para la protección frente a factores ambientales. Asimismo, el sistema exocítico se encarga de transportar proteínas de superficie y moléculas que facilitan la adhesión y la colonización del tracto digestivo del insecto vector (Marcilla et al., 2014). Por lo tanto, a través de estos mecanismos adaptativos de transporte, el parásito es capaz de establecer una relación exitosa con su hospedador invertebrado y continuar su ciclo de vida (Camacho et al., 2023).

Como se ha mencionado, la superficie celular del estadio BSF de *T. brucei*, se encuentra densamente empaquetada por proteínas VSG (Field & Carrington, 2009). Para mantener esta arquitectura que funciona como escudo, *T. brucei* sintetiza y procesa estas proteínas activamente. Por lo tanto, el transporte desde el retículo endoplásmico (ER) hacia el Golgi e incluso hacia la superficie celular, se encuentra muy activo (Grünfelder et al., 2002). La gran demanda de proteínas VSG en la superficie celular además se compensa con un mecanismo endocítico mediado por clatrina simplificado, que no requiere de la selección de carga

coordinada por los complejos de adaptina. De hecho, se ha descrito que este transporte podría ser un mecanismo de adaptación del parásito para una internalización rápida y no selectiva desde el bolsillo flagelar (Link et al., 2021). Asimismo, la gran dotación de proteínas VSG en la superficie celular depende en gran parte de los mecanismos de reciclaje hacia la membrana plasmática, por lo que, en este estadio parasitario, se suscita el incremento de esta vía (Overath & Engstler, 2004; Zuma et al., 2020).

En este estadio parasitario es importante destacar que la concentración de glicoproteínas en la superficie celular modula la velocidad del tráfico intracelular y la síntesis de nuevas proteínas (Overath & Engstler, 2004). Esto no solo influye sobre la vía endocítica, sino también sobre la exocítica, ya que las diferencias bioquímicas de las superficies celulares implican una carga diferencial en la dotación de proteínas de esa vía. Un ejemplo de ello son las glicosiltransferasas.

Adicionalmente, el incremento del flujo endocítico se asocia directamente con la infectividad sobre el huésped mamífero y con los niveles de expresión de proteínas VSG. También se ha descrito que el aumento considerable de los procesos endocíticos en el estadio BSF responde a factores externos tales como la necesidad de la eliminación rápida de anticuerpos de la superficie celular del parásito como así también para la adquisición de los nutrientes (Engstler et al., 2007; Steverding et al., 1995).

Por tanto, al comparar ambos estadios parasitarios, se puede destacar que *T. brucei* PCF presenta una endocitosis que ocurre a una velocidad y a una tasa de recambio de proteínas menor respecto a *T. brucei* BSF (Field et al., 2007). En contraste, en el estadio PCF se observa una mayor actividad de COP- I y COP- II (Demmel et al., 2011; Maier et al., 2001), cruciales para el transporte, el correcto procesamiento y la modificación de las prociclinas y otras proteínas esenciales antes de ser transportadas a la membrana plasmática (Field et al., 2007; Field & Carrington, 2009). Asimismo, mientras que en el estadio BSF, los mecanismos de reciclaje se encuentran exaltados, durante el estadio PCF, la vía de transporte hacia el lisosoma es la vía predominante (Field et al., 2007).

En la forma proliferativa *slender* se ha descrito que la endocitosis presenta una tasa

sorprendentemente rápida pero aún insuficiente respecto a la forma *stumpy*, estadio en el cual el recambio (*turnover*) endocítico es incluso más rápido (Overath&Engstler, 2004). Esta particularidad tiene sentido si se tiene en cuenta que la forma *short stumpy* se encuentra pre-adaptado a la vida dentro del insecto vector con el fin de completar, eventualmente, en él su ciclo de vida. Finalmente, luego de la diferenciación, y ya en el insecto, la tasa de endocitosis se reduce radicalmente (Langreth & Balber, 1975; Overath & Engstler, 2004). El retorno al flujo endocítico incrementado ocurre en el estadio de tripomastigote metacíclico presente en las glándulas salivales de la mosca, que como se ha mencionado, resulta ser un estadio pre-adaptado a residir y colonizar al huésped mamífero.

5.2.1.2 Diferencias entre estadios parasitarios en *T. cruzi*

La endocitosis en *T. cruzi* varía de forma significativa a lo largo de su ciclo de vida. La actividad endocítica de los epimastigotes permite un crecimiento óptimo y la adaptación a las condiciones del intestino del vector, asegurando su preparación para la transformación a tripomastigotes metacíclicos. Los epimastigotes exhiben una endocitosis activa mediada por clatrina en el bolsillo flagelar, necesaria para su crecimiento en el intestino del vector (Dhir et al., 2004; Zuma et al., 2020). A través de este mecanismo, se internalizan macromoléculas y nutrientes presentes en el intestino. A diferencia de lo que ocurre en *T. brucei* y *Leishmania*, los epimastigotes de *T. cruzi* poseen una estructura adicional conocido como complejo citostoma- citofaringe (Zuma et al., 2020) (**FIGURA 12**), principal sitio de entrada de las macromoléculas en reemplazo del bolsillo flagelar. Esta estructura consiste en una abertura en la superficie de la membrana plasmática que se invagina profundamente. Las moléculas internalizadas, luego de pasar por la citofaringe, se dirigen a compartimentos intermedios de morfología túbulo- vesicular que se extienden desde la región perinuclear hasta la región posterior de la célula.

El pH ácido junto con la cinética de transporte de carga sugiere que esta red se corresponde con los endosomas iniciales de la vía endocítica de *T. cruzi*.

Durante la fase tripomastigote, el tráfico vesicular involucra la endocitosis, exocitosis y la

modulación de la vacuola parasitófora (Salassa et al., 2020). Sin embargo, la actividad endocítica no es significativa a pesar de presentar algunas estructuras de la vía, ya que su principal objetivo no es la proliferación, sino la invasión y la evasión inmunitaria. Por lo tanto, aún a un ritmo menor, la endocitosis mediada por clatrina ocurre en el bolsillo flagelar. En este estadio, además, se exhibe la ausencia del complejo citostoma-citofaringe y los datos de la literatura sugieren que las formas metacíclicas de los tripomastigotes se mantienen a través de nutrientes previamente almacenados en los reservosomas por los epimastigotes (Porto-Carreiro et al., 2000; Zuma et al., 2020).

La vacuola parasitófora se forma cuando el tripomastigote metacíclico invade la célula. La misma se forma inicialmente a partir de la membrana plasmática del hospedador, pero se modifica a medida que el parásito transporta otras vesículas intracelulares, como endosomas tempranos y tardíos, y lisosomas (Barrias et al., 2013). Por lo tanto, en el interior de la vacuola, se desarrolla un transporte vesicular que le permite al parásito sobrevivir y replicarse dentro de las células hospedadoras. La interacción del parásito con las vesículas intracelulares del hospedador permite el intercambio de nutrientes, la modificación del entorno intracelular, y la regulación de la salida del parásito una vez que está listo para diseminarse. El parásito también secreta proteínas y lípidos hacia la vacuola parasitófora para modificar su estructura y mantener un ambiente adecuado para la replicación mediante fisión binaria (Zuma et al., 2020). Durante todo este proceso, se produce la diferenciación de tripomastigote a amastigote.

La dependencia de las condiciones del entorno intracelular subraya la adaptabilidad de los amastigotes a la vida dentro de las células del hospedador, maximizando la utilización de los recursos disponibles para su replicación (Pereira et al., 2011; Sant'Anna et al., 2008; Waghbi et al., 2005). Por lo tanto, en los amastigotes intracelulares la endocitosis se lleva a cabo para aprovechar los recursos del citoplasma del hospedador a través de la endocitosis no mediada por clatrina y la macropinocitosis. Luego, se produce la modificación de la vacuola parasitófora para el escape, lo cual involucra la secreción de enzimas degradativas que digieren su membrana, permitiendo que los amastigotes recién replicados escapen al citoplasma del

hospedador (Ley et al., 1990).

5.3 Regulación del tráfico vesicular por GTPasas Rab

Tal como en eucariotas superiores, la especificidad del transporte vesicular en los tripanosomas está a cargo de las GTPasas Rab (Dhir et al., 2004). Ya que el bolsillo flagelar constituye el único lugar de endocitosis en este parásito, las proteínas Rab están altamente especializadas para regular el tráfico vesicular (vías exocíticas, endocíticas y en la vía de transporte retrógrado), la captación de nutrientes y la remodelación de la membrana plasmática (Field & Carrington, 2009). Además, en *T. brucei*, las proteínas Rab están implicadas en la biogénesis del bolsillo flagelar, ya que están principalmente centradas en el reciclaje de proteínas de superficie como las VSG al bolsillo flagelar. La relevancia de los procesos endocíticos durante el estadio sanguíneo BSF, se refleja en la presencia de dos subpoblaciones de endosomas tempranos, TbRab5A y TbRab5B, respecto a la única población presente en células PCF (Field et al., 2007). TbRab5A actúa directamente en la internalización de moléculas desde la membrana plasmática (VSG y la transferrina endocitada por un receptor) y se localiza en vesículas endocíticas tempranas, mientras que TbRab5B desempeña un papel más activo en las etapas de transición y la maduración de los endosomas (Pal et al., 2002). Por su parte, TbRab11 participa en el reciclaje de vesículas, especialmente en la redistribución de proteínas VSG y regula la secreción de vesículas hacia el medio extracelular y la exocitosis en el bolsillo flagelar (Grünfelder et al., 2003; Hall et al., 2005; Umaer et al., 2018). Por lo tanto, mientras que la endocitosis mediada por Rab5 permite que las VSG a reemplazar sean retiradas de la superficie celular y degradadas en los compartimentos intracelulares, durante la exocitosis las nuevas VSGs sintetizadas en el RE y procesadas en el Golgi, son transportadas por vesículas exocíticas asociadas a Rab11 hacia la membrana plasmática para reemplazar a las VSG degradadas (Grünfelder et al., 2003; Hall et al., 2005; Umaer et al., 2018).

Asimismo, las proteínas Rab también regulan el transporte mediante su interacción con proteínas de anclaje y motores moleculares que efectúan el transporte físico de las vesículas. Es así como Rab5 regula la captación endocítica y el transporte de vesículas a lo largo de los microtúbulos mediante la interacción con la dineína y Rab11 regula el transporte de vesículas

hacia la membrana plasmática, interactuando con motores de actina como miosina V, que dirige las vesículas hacia el bolsillo flagelar, donde ocurre la exocitosis.

En *T. cruzi*, por su parte, el desafío es equilibrar el tráfico vesicular entre sus diferentes estadios ya que, en la fase de tripomastigote, el tráfico vesicular está orientado hacia la invasión celular y la evasión inmunológica, mientras que en la fase amastigote intracelular, el tráfico vesicular se adapta a funciones de degradación de nutrientes y mantenimiento de la homeostasis celular. En ambos estadios parasitarios, el transporte se encuentra guiado por TcRab11 y TcRab5 (Salassa et al., 2020; Wilkowsky et al., 2002).

5.4 Exocitosis en eucariotas superiores y *T. brucei*

Las vesículas extracelulares (EV) son un grupo heterogéneo de estructuras membranosas que derivan y se liberan de la célula. Estas estructuras son clasificadas por sus mecanismos de biogénesis o según su tamaño, por lo que se reconocen exosomas, microvesículas (MV) y cuerpos apoptóticos (Trams et al., 1981) (**FIGURA 20**). Sin embargo, de manera general, se puede realizar una distinción de las EV en dos clases: los exosomas derivados de la vía exocítica, generalmente asociadas con la formación de MVB, y los ectosomas o microvesículas, los cuales son generados por brotación de la membrana plasmática.

Mientras que los ectosomas, de entre 100 y 1000 nm, son liberados al espacio extracelular por brotación directa desde la membrana plasmática (György et al., 2011; Raposo & Stoorvogel, 2013), los exosomas presentan entre 30 a 100 nm de diámetro y son secretados tras la fusión de los cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plasmática (**FIGURA 21**). Aunque hay diferencias respecto a la biogénesis de ambas estructuras, los estudios en células de mamífero demostraron que ambas rutas comparten la misma maquinaria implicada en su generación: Tetraspanin (Hemler, 2003) y/o la maquinaria ESCRT (Colombo et al., 2013).

Las bacterias y las células eucariotas utilizan las EV como un vehículo para transportar proteínas reguladoras, lípidos y ácidos nucleicos a las células vecinas, incluso, como medio de comunicación célula-célula, ya sea en una misma especie o entre distintas (Schorey et al., 2015). Las que se producen durante una infección pueden derivar del patógeno o del huésped.

Las extensas funciones atribuidas a las EV se ven reflejadas en los diversos mecanismos llevados a cabo para su biogénesis y por su composición (Schorey et al., 2015). De hecho, cada especie secreta exosomas con un contenido específico que modula una gran variedad de procesos biológicos (Choi et al., 2013) (**FIGURA 22**). Por ejemplo, los RNA transportados por los exosomas son los responsables de modular las interacciones parásito: parásito o parásito: células huésped.

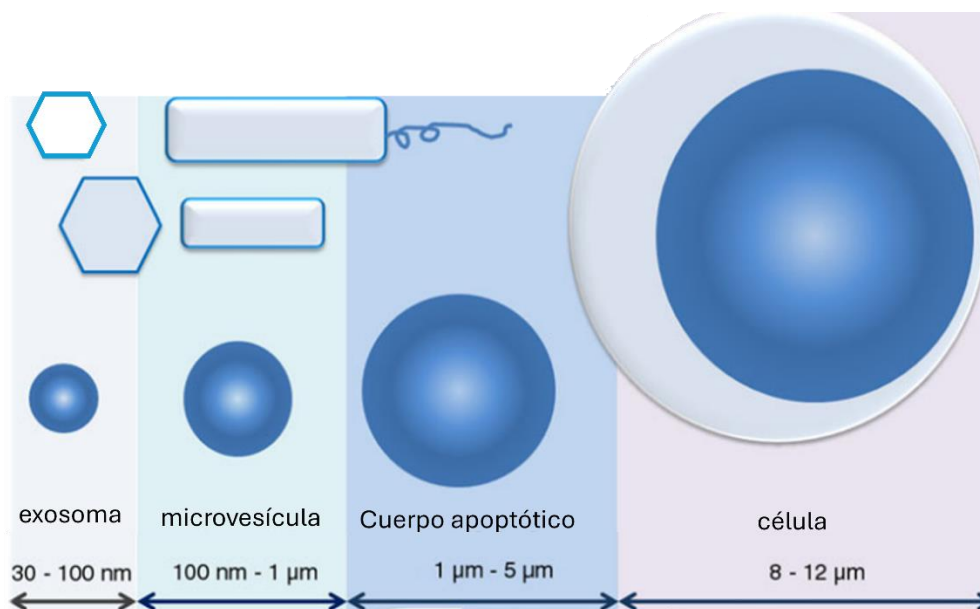


FIGURA 20. Esquema de las distintas vesículas extracelulares. Arriba. Las poblaciones principales incluyen exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Para simplificar la Figura, no se muestra que las células liberen todos los tipos de vesículas. Abajo. Rangos de tamaño de los principales tipos de vesículas de membrana. Mientras que los exosomas comparten la distribución de tamaño con los virus, las microvesículas se superponen en tamaño con las bacterias y los agregados de proteínas (p. ej., complejos inmunes). Tanto los cuerpos apoptóticos como las plaquetas se encuentran en el rango de tamaño de 1 a 5 µm. Esquema modificado de György et al., 2011.

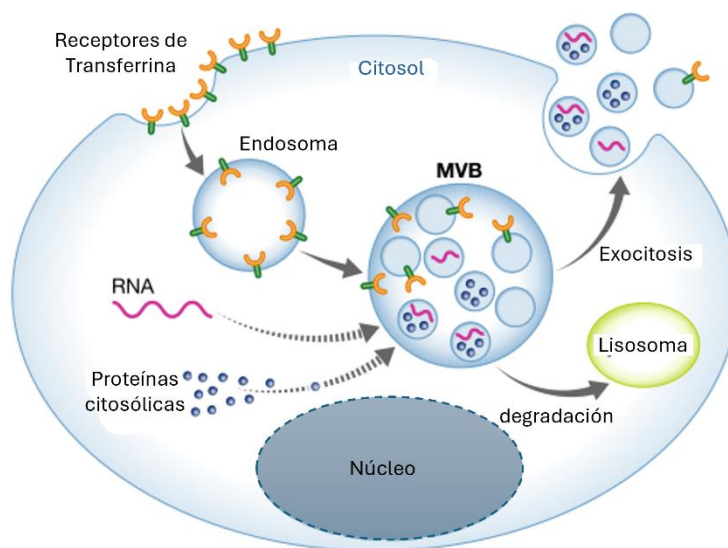


FIGURA 21. Biogénesis de exosomas. Los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos se transportan a los MVB dentro de los ILV, que, tras la fusión del MVB con la membrana plasmática, se liberan como exosomas.

Originalmente identificadas como una forma de liberar el receptor de transferrina de los reticulocitos en maduración, se ha demostrado que otras proteínas de la membrana plasmática se dirigen a los MVB a través de varios mecanismos y se liberan mediante exosomas.

El ARN y las proteínas citoplasmáticas también se transportan a los MVB, aunque los mecanismos que median este transporte son menos conocidos (indicados por la línea discontinua)(Schorey et al., 2015).

En *T. cruzi*, las EV de los diferentes estadios del ciclo de vida han sido aisladas (Bonfim-Melo et al., 2018; Moreira et al., 2019; Neves et al., 2014). Los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos secretan grandes ectosomas que brotan directamente desde la membrana celular que rodea el flagelo y pequeños exosomas, que presumiblemente derivan del MVB y que son liberados desde el bolsillo flagelar (Bayer-Santos et al., 2013). Estos datos sugieren que puede haber al menos dos vías de biogénesis de EV en *T. cruzi* (Camacho et al., 2023; Eliaz et al., 2017a). Tanto en *T. cruzi* como *Leishmania spp*, se ha observado que las EV liberadas interactúan y modulan la respuesta inmune de las células del huésped (Marcilla et al., 2014). En el caso de *T. cruzi*, las EV son consideradas reguladoras de la forma aguda y la forma crónica de la Enfermedad de Chagas, ya que median la modulación de la inflamación e intervienen en la señalización remota entre tripomastigotes extracelulares y amastigotes intracelulares en diversos nichos de células huésped (Torró et al., 2018) (**FIGURA 22**).

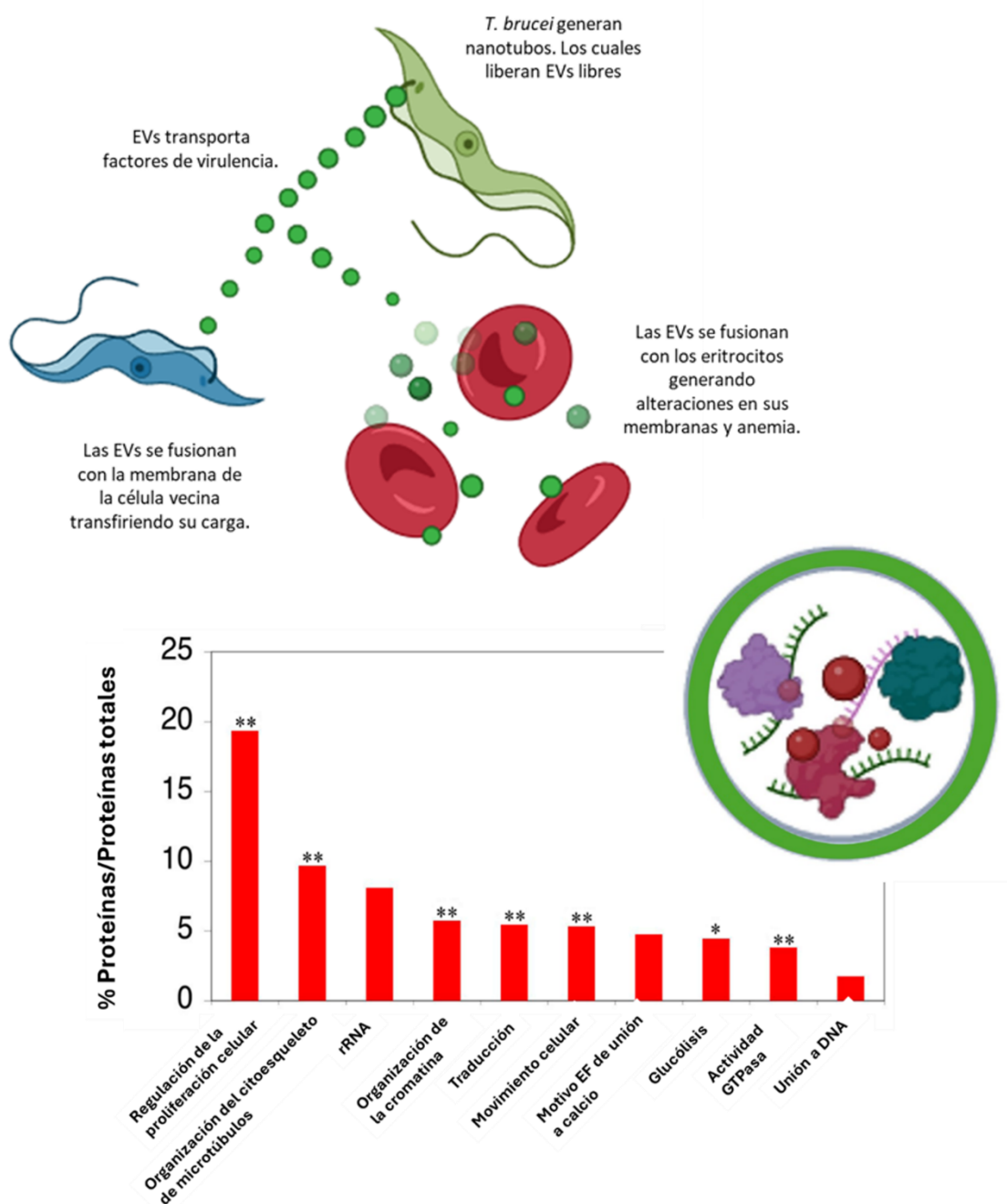


FIGURA 22. Arriba. La comunicación intercelular entre parásitos y con células hospedadoras proporciona mecanismos para el desarrollo de parásitos, la evasión inmunológica y la patología de la enfermedad. *T. brucei* BSF producen nanotubos membranosos que se originan en la membrana flagelar y se disocian en vesículas extracelulares libres (EV). Las EV contienen proteínas flagelares que contribuyen a la virulencia e infectividad en humanos. Además, las EV de tripanosomas también pueden fusionarse con eritrocitos del huésped mamíferos, lo que provoca una rápida depleción de

eritrocitos y anemia. *Esquema extraído y modificado de Szempruch et al., 2016. Abajo. Proteínas identificadas en el interior de EV mediante espectrometría de masas.* El análisis proteómico de las EVs reveló 156 proteínas de diversas clases funcionales. La mayoría de las proteínas incluidas en las vesículas tienen un rol esencial en la invasión y proliferación de las células huésped.

Asimismo, las EV liberadas por este parásito promueven la invasión de la célula huésped, la colonización del vector y la metacicloogénesis (Camacho et al., 2023; Garcia-Silva et al., 2014; Moreira et al., 2019; Neves et al., 2014; Ramirez et al., 2017; Trocoli Torrecilhas et al., 2009; Wyllie & Ramirez, 2017).

T. brucei también genera exosomas que derivan de los MVB. Los mismos han sido relacionados con la regulación de la motilidad social, proceso crucial durante la invasión del vector y la proliferación (Saada et al., 2015). Además, se han registrado un subgrupo de EV particulares generadas en el bolsillo flagelar y secretados en nanotubos (Field & Carrington, 2009; Szempruch et al., 2016). Los nanotubos son proyecciones de membrana filamentosas altamente dinámicas de hasta 20 μm que brotan desde el bolsillo flagelar y liberan EV (Szempruch et al., 2016) **(FIGURA 23)**. Las EV derivadas de estas estructuras fueron primeramente identificadas en *T. brucei* BSF y luego en el estadio PCF (Eliaz et al., 2017a). Los nanotubos o plasmanemes fueron descritos en *T. brucei* en 1960s (Vickerman, 1969). El rol de estas estructuras es incierto, pero los autores sugieren que son el origen de las EV en *T. brucei*. En los primeros estudios, los autores observaron que a través de los nanotubos se producía la interacción transitoria entre parásitos vecinos, cumpliendo un rol en la comunicación entre células **(FIGURA 23)**. Los nanotubos fueron visualizados en *T. brucei* BSF mediante microscopía de vídeo de contraste de interferencia diferencial (DIC) como estructuras filamentosas altamente dinámicas (2-20 μm) extendiéndose desde el extremo posterior de algunas células (Szempruch et al., 2016; Vickerman, 1969) **(FIGURA 23)**. Un aspecto muy destacable en relación con los nanotubos es que los exosomas difieren morfológicamente de las EV secretadas desde los nanotubos a pesar de ser, aparentemente, secretadas desde el bolsillo flagelar.

Actualmente se sabe poco sobre las vías de biogénesis de las EV de kinetoplástidos, sin embargo, al menos en el caso de *T. cruzi*, múltiples condiciones de estrés, como la falta de

nutrientes, la temperatura y el pH bajos, el estrés nitrosativo y los desafíos impuestos por las células hospedadoras desencadenan su liberación (Camacho et al., 2023a; Vasconcelos et al., 2021). En el caso de *T. brucei*, la formación de nanotubos *in vitro* se lleva a cabo mediante el silenciamiento de proteínas esenciales o por la adición medio de cultivo con suero activado (Szempruch et al., 2016) y se ha reportado que, la secreción de exosomas ocurre ante eventos de disrupción del proceso de trans-splicing del RNA como también ante situaciones de estrés como el shock térmico (Eliaz et al., 2017). Esto apunta a que la liberación de EV es un proceso estrechamente regulado en estos parásitos, con diferentes vías biogénicas posiblemente activadas por diferentes factores estresantes.

Durante la formación de los exosomas, uno de los eventos cruciales es la acumulación y transferencia de proteínas ubiquitinadas desde la membrana plasmática a los endosomas y las ILV. Según se ha reportado, los exosomas derivados de los MVB son generados a través de la maquinaria ESCRT. Al respecto, se ha descrito recientemente que el protozooario *Giardia lamblia*, aunque carece de una vía endolisosomal clásica, es capaz de liberar vesículas similares a exosomas dependiendo de la ATPasa Vps4 asociada a ESCRT, Rab11 y ceramidas. Además, el papel que cumple el subcomplejo ESCRT-III durante la formación de EV ha sido descrito en células de mamífero y, recientemente, en otros microorganismos eucariotas. En *T. vaginalis*, los análisis de datos proteómicos de exosomas y ectosomas aislados permitieron identificar a la proteína Vps32/ Snf7, como la proteína involucrada en la biogénesis, el transporte y la clasificación de las EV (Salas et al., 2022). Asimismo, se ha demostrado que Vps32 cumple un rol central en la regulación de la adhesión del parásito a las células prostáticas y contribuye a la patogénesis de *T. vaginales*.

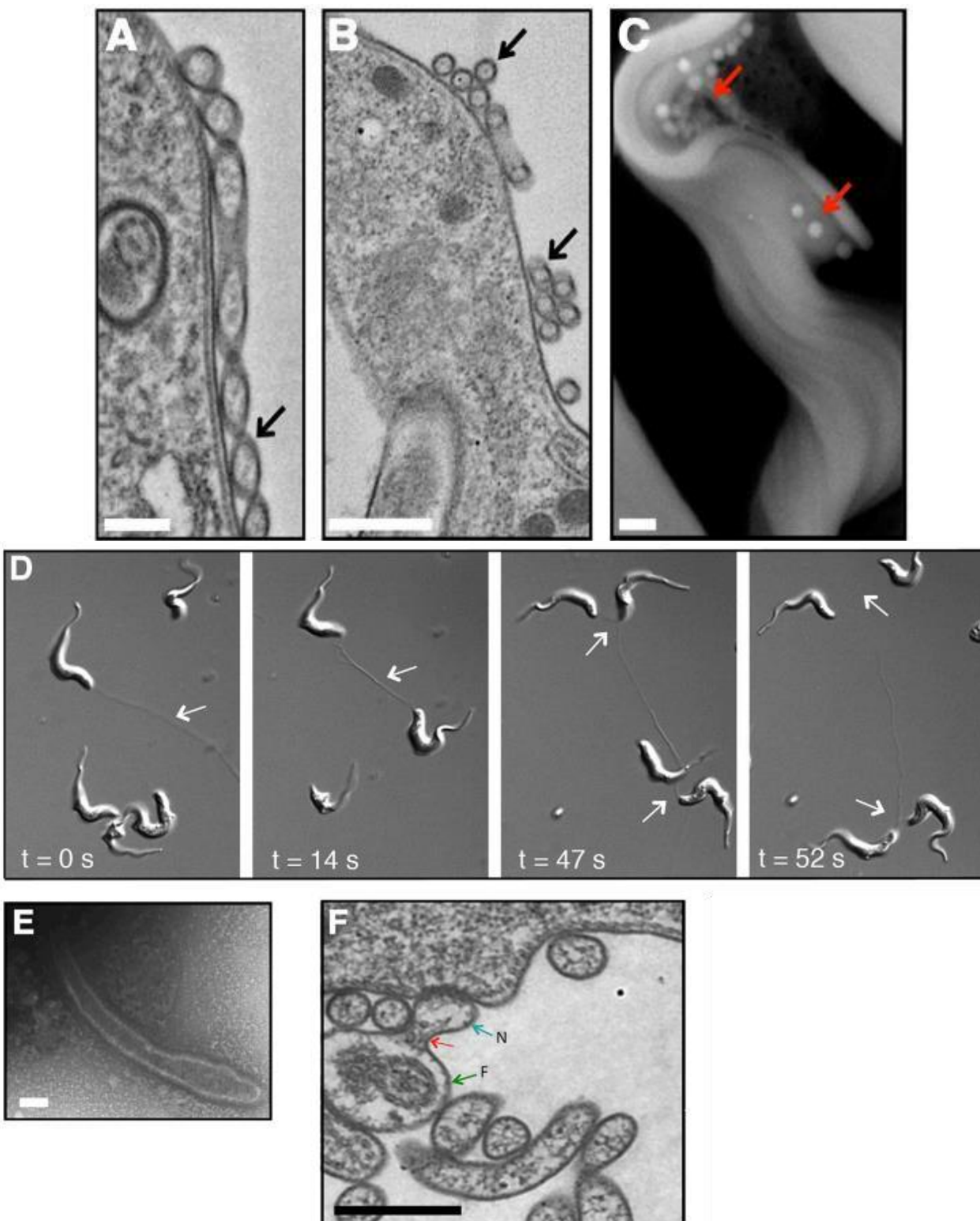


FIGURA 23. Nanotubos de *T. brucei* BSF. Las secciones longitudinales a través de nanotubos revelaron unidades esféricas repetidas que se asemejan a las cuentas de un collar y se disponen por fuera del bolsillo flagelar en la superficie celular. A. TEM de nanotubos (flecha Negra, barra de escala 400 nm). B. TEM de los nanotubos observados como unidades esféricas (flecha negra, barra de escala

500 nm). **C.** Vesículas extracelulares (EVs) libres (flechas rojas) en la superficie del tripanosoma visualizado por SEM. Barra de escala, 400 nm. **D.** Las imágenes de células vivas revelaron la dinámica de los nanotubos de membrana y las interacciones con múltiples células en marcos DIC secuenciales. Se puede evidenciar la conexión entre células a través de los nanotubos. **E.** Nanotubo naciente visualizado mediante TEM. Barra de escala, 100 nm. **F.** La sección delgada de TEM mostró la membrana flagelar (flecha verde, F) brotando (flecha roja) hacia el nanotubo (flecha azul, N). Barra de escala, 500 nm. Imágenes extraídas de Szempruch et al., 2016.

Sin embargo, en *T. brucei*, la maquinaria ESCRT aún no ha sido asociada directamente con la biogénesis de EV desde el bolsillo flagelar. De hecho, sólo se ha descrito que el silenciamiento génico de TbVps36, miembro de ESCRT-II, compromete la secreción de los exosomas (Eliaz et al., 2017) (**FIGURA 24**). Por lo tanto, en *T. brucei* sólo Vps36 ha sido descrito como un elemento crítico durante la secreción de exosomas derivados de MVB (Eliaz et al., 2017). Por el contrario, mediante estos mismos estudios se reveló que no se inhibe la secreción de EV derivados de los nanotubos y que las mismas poseen características bioquímicas distintas a los exosomas clásicos debido a que su origen y su mecanismo de formación es completamente distinto.

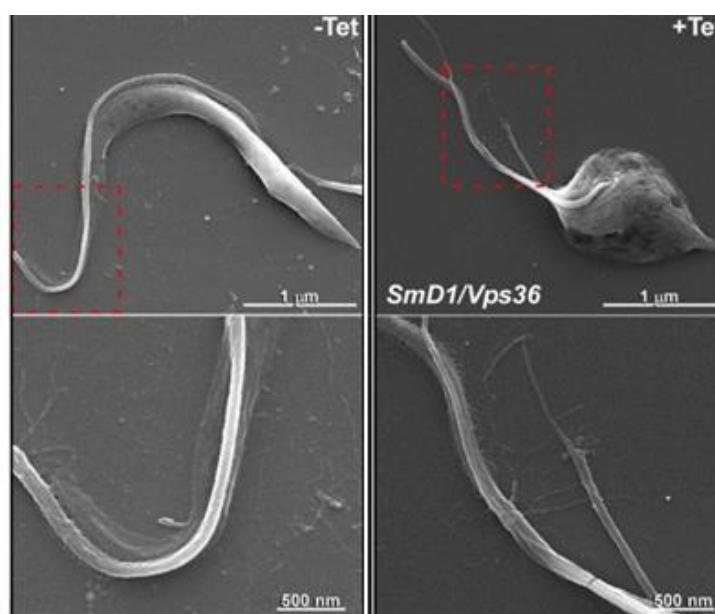


FIGURA 24. El silenciamiento de Vps36 produce nanotubos próximos al bolsillo flagelar. Las imágenes de SEM de alta resolución corresponden a células antes del silenciamiento de TbVps36 (Tet-) y luego de 40 horas de silenciamiento (Tet+). En los paneles inferiores se exhibe la imagen en mayor aumento de la sección en rojo del panel superior (zoom) (Eliaz et al., 2017b).

Respecto a *T. cruzi*, las vías biogénéticas de las EV continúan siendo casi completamente desconocidas y aún no se han caracterizado proteínas ESCRT participantes a pesar de su presumible existencia (Leung et al., 2008).

De manera similar, pocos han investigado la biogénesis de las EV de *Leishmania*, pero se han encontrado análogos de los subcomplejos ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III, cuyas funciones en la biogénesis de las EV, continúan sin explorarse (Leung et al., 2008). Los conocimientos respecto a la maquinaria ESCRT y su incidencia en la biogénesis de EV de los parásitos más estudiados gráficamente se detallan en la **FIGURA 25**.

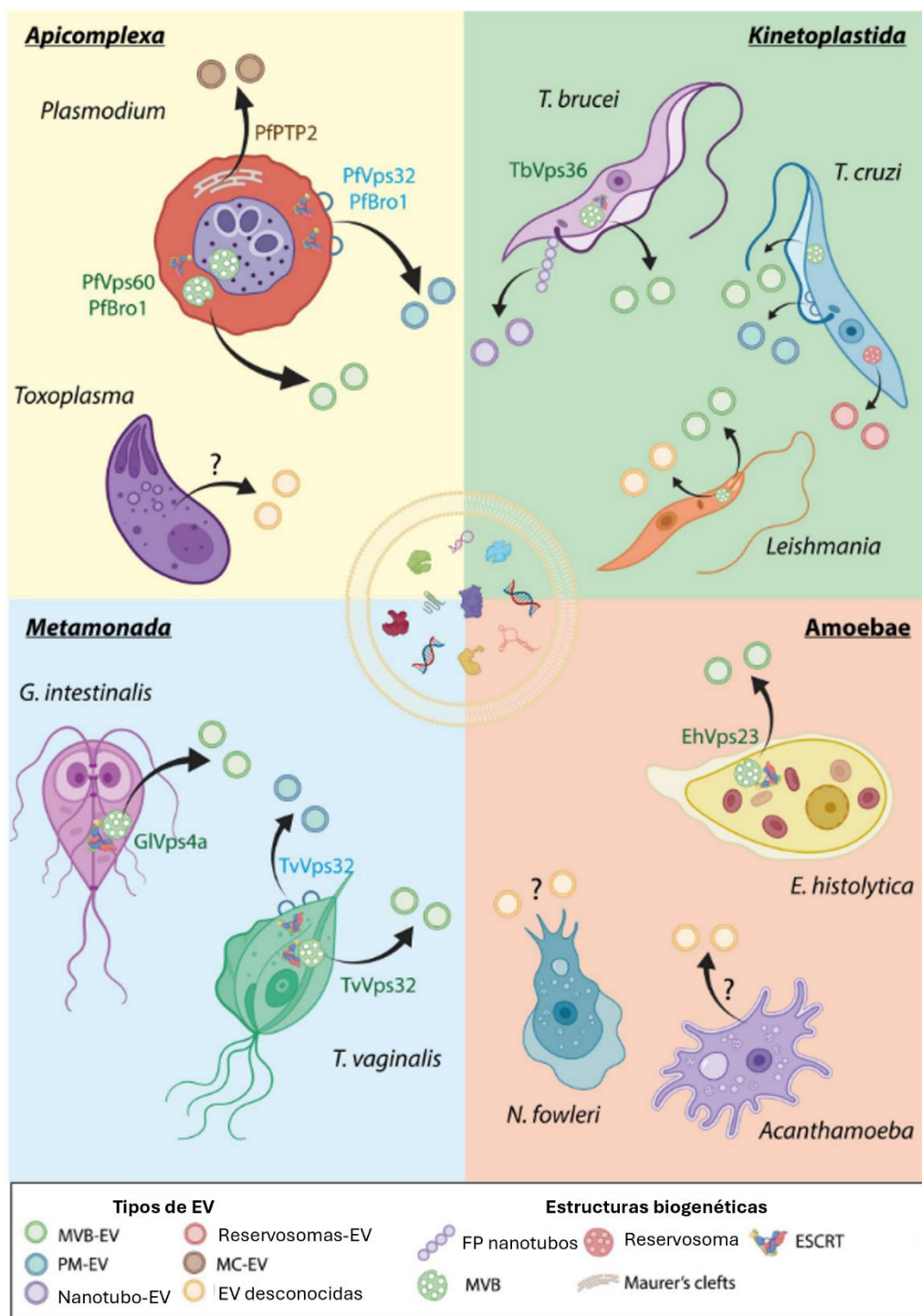


FIGURA 25. Resumen de la biogénesis de EVs y la participación de la proteína ESCRT. El conocimiento actual sobre los mecanismos de biogénesis de EVs en los parásitos más estudiados son representados en este esquema. Los colores de las EVs reflejan sus orígenes biogénicos: exosomas derivados de MVB (verde), ectosomas derivados de la membrana plasmática (azul), EV derivadas de nanotubos (violeta), EV derivadas de reservosomas (rojo), EV derivadas de la hendidura de Maurer (marrón) o EV de origen desconocido (*unknown-EV*, amarillo). El símbolo “?” indica que la secreción de EVs no ha sido probada en esos parásitos o que se ha demostrado que secretan EVs, pero se desconoce su biogénesis (*T. gondii*

y *Acanthamoeba*). Se indican las proteínas ESCRT específicas que se ha demostrado experimentalmente que participan en cada ruta biogenética. EVs: vesículas extracelulares; FP: bolsillo flagelar; MVB, cuerpos multivesiculares; PM: membrana plasmática. Esquema extraído de Camacho et al., 2023a.

5.6 Citoquinesis y Tráfico vesicular

Citoquinesis

En las células animales, la citoquinesis comienza en la anafase con la contracción de un anillo de actomiosina (complejo de proteínas formado principalmente por actina y miosina) asociado a la membrana en el plano medio de la célula, lo que conduce a la formación de un surco de segmentación (Andrade et al., 2022; Andrade & Echard, 2022; D. Yang et al., 2008) **(FIGURA 26)**. Este proceso es seguido por la formación de un puente intercelular (ICB) que conecta las células hijas, en cuyo centro se encuentra una estructura prominente y rica en proteínas conocido como cuerpo medio (*midbody*). El cuerpo medio se encuentra compuesto por septina, cuya función es estabilizar el puente intercelular, y por una estructura altamente densa llamada “*densidad central o matriz del cuerpo medio*” que funciona como una plataforma de reclutamiento de proteínas esenciales para la abscisión, como las que conforman el subcomplejo ESCRT-III, y como centro organizador para el tráfico vesicular (D’Avino et al., 2015; Frémont & Echard, 2018). El fino puente intercelular constituye el sitio de la abscisión y está constituido por microtúbulos remanentes del huso mitótico, los cuales permanecen organizados a lo largo del cuerpo medio hasta el momento de la abscisión y son responsables de transportar vesículas y proteínas hasta este sitio (Frémont & Echard, 2018; Pust et al., 2023).

Finalmente, durante la etapa de abscisión, última etapa de la citoquinesis, se produce la fisión de la membrana plasmática del puente intercelular con la consiguiente separación de la célula en dos células hijas, hecho que determina la finalización de la citoquinesis (Andrade & Echard, 2022).

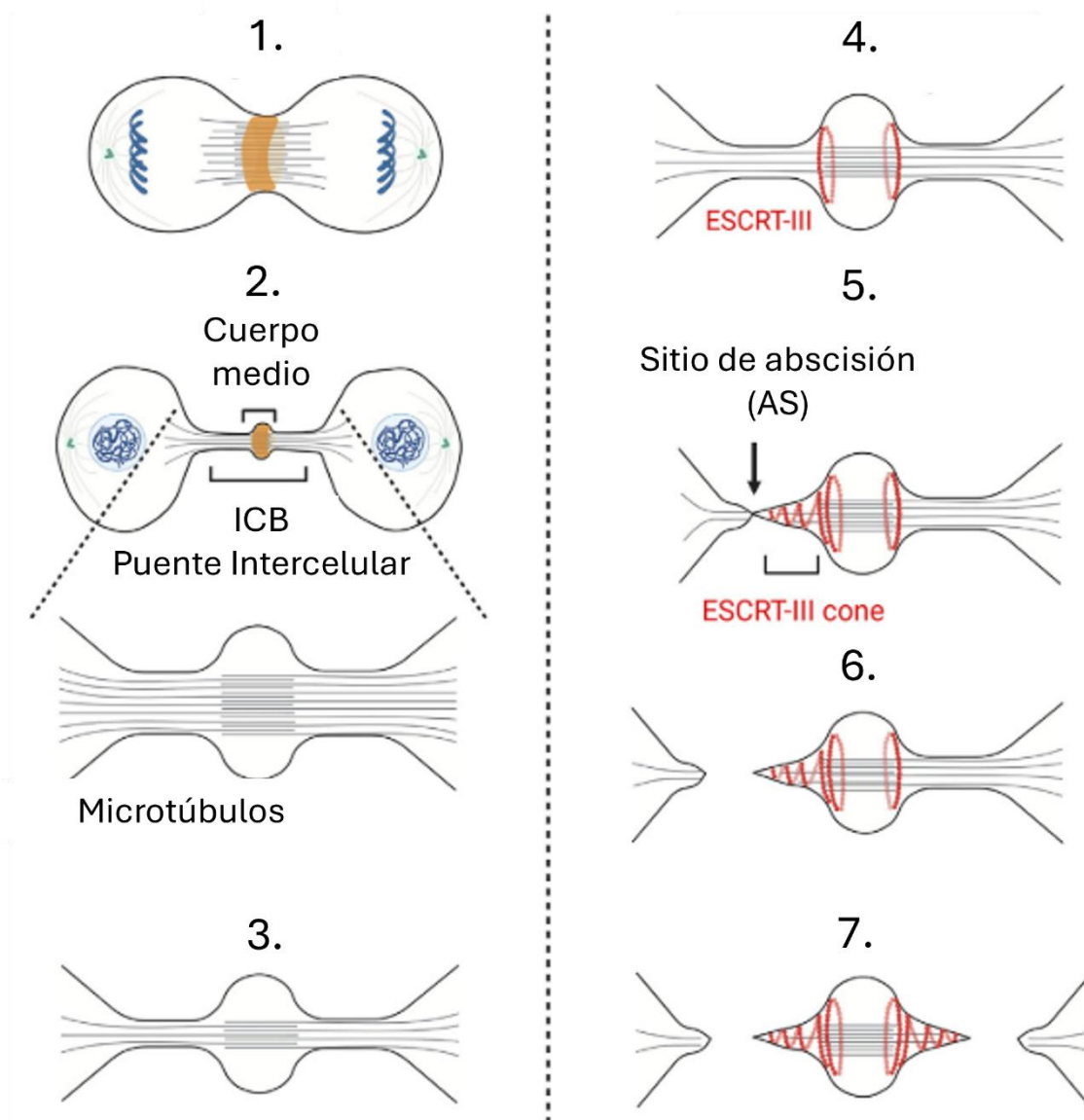


FIGURA 26. Etapas de la citoquinesis. Paso 1: contracción de un anillo de actomiosina (naranja) durante la ingresión del surco. Paso 2: formación del Puente Intercelular (ICB) y del cuerpo medio (*midbody*) que contiene microtúbulos antiparalelos (líneas grises). Paso 3: adelgazamiento del ICB. Paso 4: reclutamiento de ESCRT-III al cuerpo medio. Paso 5: polimerización de ESCRT-III (curvas rojas) en un lado del cuerpo medio y corte de los microtúbulos. Paso 6: abscisión de la membrana del ICB (abscisión). Paso 7: liberación del remanente del cuerpo medio. Esquema modificado Andrade & Echard, 2022.

5.6.1 ESCRT y citoquinesis

Durante la división celular, el proceso de abscisión es dependiente de la maquinaria ESCRT. De hecho, la división celular es la función más antigua reconocida de ESCRT-III y Vps4 (Samson et

al., 2008b, 2008a). Además de su acción directa, ESCRT cumple un rol indirecto en la citoquinesis participando activamente en la coordinación y la regulación del tráfico vesicular cuando es reclutado en el cuerpo medio previo a la abscisión.

Durante la citoquinesis, ESCRT es reclutado y se activa directamente en el cuerpo medio sin requerir la señalización de proteínas ubiquitinadas, lo cual hace que este evento sea independiente de la activación de ESCRT-0 (Carlton & Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007). En este contexto, los complejos ESCRT-I, ESCRT-II, y sobre todo ESCRT-III, son los principales subcomplejos que se reclutan en el sitio de abscisión.

Cuando ESCRT es reclutado, se produce la interacción de dos proteínas clave: Tsg101/Vps23 y Alix (Bro-1 en *S. cerevisiae*), ambas pertenecientes ESCRT-I (Agromayor & Martin-Serrano, 2013; Carlton et al., 2012a; Morita et al., 2007). Estas proteínas funcionan como proteínas adaptadores entre la membrana del puente intercelular y ESCRT-III. Específicamente, Alix interactúa directamente con CHMP4B (isoforma de CHMP4, ortólogo humano de Snf7/Vps32) lo cual estimula el ensamblaje del subcomplejo ESCRT-III (Pust et al., 2023). La manera en la que ESCRT-III se organiza espacialmente dentro del puente intercelular se observa en la

FIGURA 27.

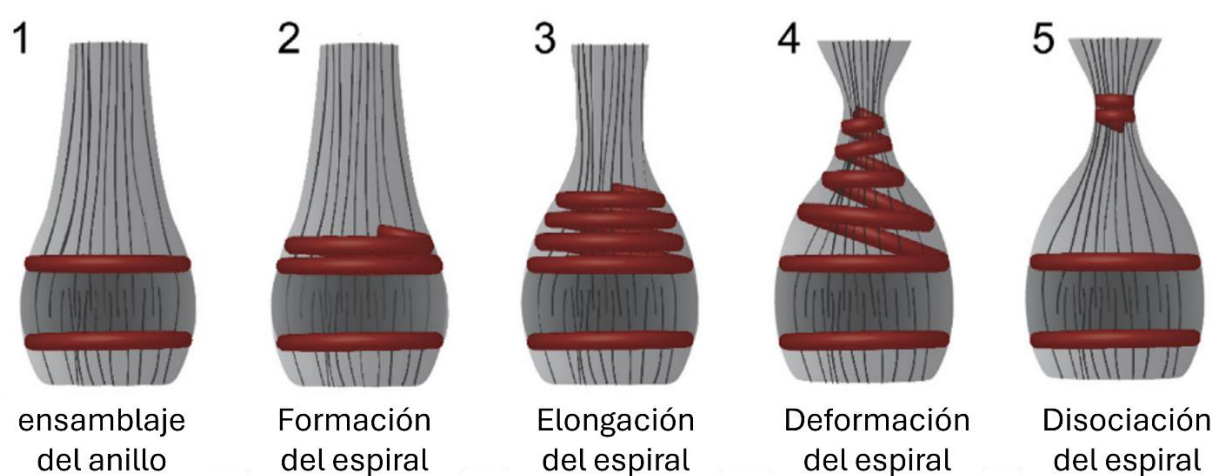


FIGURA 27. Secuencia temporal de la organización estructural de ESCRT-III durante la etapa de abscisión. Los números indican las distintas etapas, desde las etapas tempranas a las etapas tardías de abscisión. En gris se destacan los microtúbulos y en rojo, ESCRT-III (Goliand et al., 2018).

El tráfico vesicular hacia el cuerpo medio durante la división celular garantiza la correcta

segregación del contenido de material genético y de las estructuras subcelulares en ambas células hijas. Este transporte vesicular se encuentra regulado durante la citoquinesis por las proteínas Rab, las cuales contribuyen al reclutamiento de ESCRT en el cuerpo medio. Las Rab interactúan con los complejos a través de proteínas adaptadoras, por lo tanto, aunque el mecanismo no está completamente dilucidado, se ha propuesto que los efectores de Rab11 (proteínas de la familia FIP o *Rab11 Family-Interacting Proteins*), podrían mediar una serie de interacciones que facilitan el reclutamiento de ESCRT (Schiel et al., 2012; Schiel & Prekeris, 2013). Según este mecanismo, durante la citoquinesis, Rab11 asociada con FIP3 y los endosomas de reciclaje, contribuyen a direccionar las vesículas hacia el cuerpo medio, al tiempo que reclutan ESCRT-III. De esta manera, las interacciones entre FIP3 y Rab11, ayudan a posicionar a ESCRT-III en el lugar correcto para la abscisión (**FIGURA 33**).

5.6.1.1 ESCRT-III durante la citoquinesis.

Durante la citoquinesis, la mayoría de las proteínas ESCRT-III (CHMP1A/B, CHMP2A/B, CHMP3, CHMP4A-B-C, CHMP5, CHMP6, IST1, pero no CHMP7) son reclutadas en el cuerpo medio luego del estrechamiento de la membrana y polimerizan formando filamentos y anillos en el sitio de abscisión. De hecho, la microscopía 3D y la tomografía electrónica han mostrado filamentos helicoidales a lo largo de la superficie interna del cuerpo medio que se corresponden con los polímeros ESCRT-III (Guizetti & Gerlich, 2012). Particularmente, CHMP4, forma filamentos helicoidales cuando polimeriza sobre la superficie de la membrana plasmática, con la asistencia de CHMP2 y CHMP3. La polimerización y la organización de los polímeros en filamentos generan la curvatura de la membrana y la consecuente tensión. El mecanismo real de deformación y constricción de la membrana durante la citoquinesis es poco comprendido, por lo que se sugieren tres modelos alternativos al respecto (**FIGURA 28**). Dos modelos explican el mecanismo de deformación y constricción de la membrana a través de la internalización del filamento en el puente intercelular (**FIGURA 28a-b**) y uno de ellos involucra a los endosomas asociados con Rab11 (**FIGURA 28c**), los cuales se fusionan continuamente con la membrana plasmática dentro del cuerpo medio, estrechando así el puente intercelular (Elia et al., 2012; Guizetti & Gerlich, 2012; Schiel et al., 2012; D. Yang et al., 2008). Si bien en

este último modelo parecería no tener injerencia, de manera general, la ATPasa Vps4 es involucrada en el evento de abscisión final, luego del correspondiente reclutamiento de CHMP4B y antes del corte de membrana en el cuerpo medio (Bajorek et al., 2009). Tal como demuestra uno de los modelos más aceptados, el posible rol de Vps4 se focaliza en la remodelación de los polímeros unidos a la membrana, lo cual conduce a la tensión de la misma y la consecuente constricción (Elia et al., 2012; Guizetti & Gerlich, 2012) (**FIGURA 28b**).

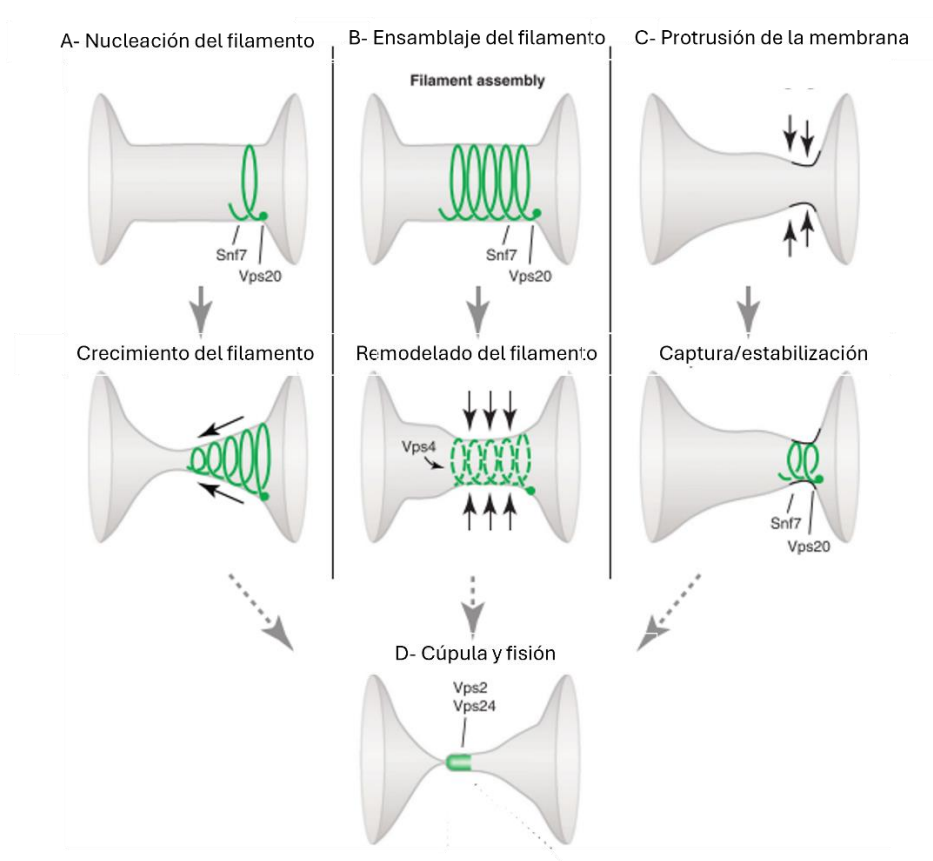


FIGURA 28. Esquemas de los tres modelos propuestos por los cuales se produce la constricción de las membranas durante la citocinesis mediada por ESCRT-III (Guizetti & Gerlich, 2012).

5.6.2 Regulación de la citocinesis celular: participación de CHMP4 (Vps32) y Vps4

Existe una relación directa entre los eventos endocíticos, la composición de las membranas y su tensión, los puntos de control de la citocinesis y la maquinaria ESCRT-III. El *NoCut checkpoint* de la citocinesis, evolutivamente conservado en eucariotas, responde a varias señalizaciones incluyendo la anormal presencia de puentes de cromatina en el puente

intercelular (Capalbo et al., 2012; Petsalaki & Zachos, 2019, 2021; Thoresen et al., 2014). Se ha descrito que, ante algún defecto en la segregación de los cromosomas, una proteína denominada ANCHR (*Abscission/NoCut Checkpoint Regulator*, también conocida como ZFYVE19) se asocia a Vps4 en el cuerpo medio, en un proceso dependiente de la Aurora quinasa B y CHMP4C (isoforma de CHMP4 de *H. sapiens*). Esta asociación impide que Vps4 se relocalice en el sitio de abscisión (**FIGURA 29**). Por lo tanto, se retrasa la separación final de las células hijas en respuesta a la presencia de cromatina atrapada en el puente intercelular, evitando así el daño en el ADN y la aneuploidía. Cuando se produce la desfosforilación de la Aurora quinasa B y ésta se inactiva, la retención de Vps4 en el cuerpo medio se alivia para permitir la abscisión (Thoresen et al., 2014).

La fosforilación de CHMP4C por la Aurora quinasa B responde a otro punto de control de la citoquinesis e involucra al CPC (*Chromosomal Passenger Complex*). Este complejo produce la formación y estabilización de la zona media del huso y la regulación de la formación del anillo contráctil. Además, regula la ingresión del surco y el punto de control de la abscisión. El complejo CPC está compuesto por la proteína INCENP, Borealina, Survivina y Aurora B y su asociación modula la actividad de CHMP4C durante la citoquinesis tardía (Capalbo et al., 2012). Este mecanismo de regulación contempla el estado cerrado y abierto de CHMP4C (no se incluye en él a sus parálogos CHMP4A y CHMP4B) con la participación de la Aurora quinasa B (Capalbo et al., 2012). De acuerdo con ello, durante la citoquinesis tardía, el CPC se encuentra en el cuerpo medio, de manera que la Aurora quinasa B fosforila e inactiva a CHMP4C; mientras tanto, durante la etapa de abscisión, CPC se aleja del cuerpo medio y la Aurora quinasa B no puede fosforilar a CHMP4C, por lo cual ésta se mantiene activa, forma polímeros y produce el corte de membrana en el sitio de abscisión (**FIGURA 30**).

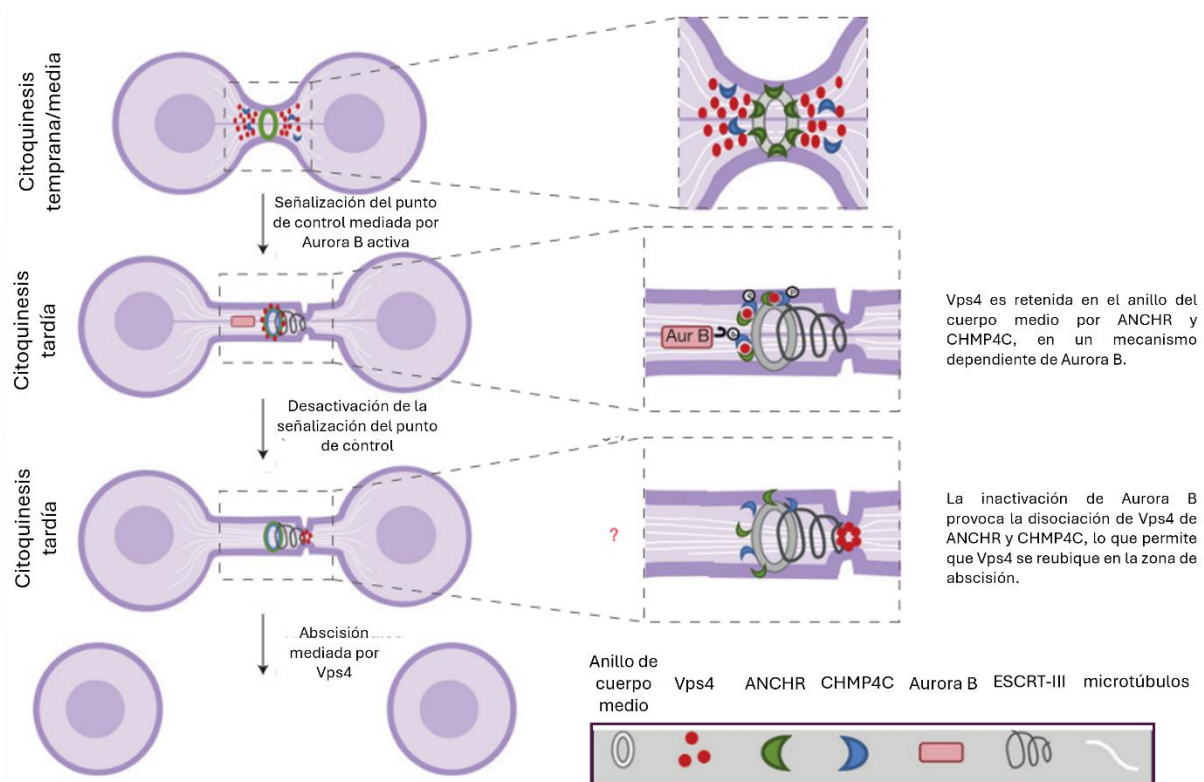


FIGURA 29. Punto de control de la abscisión mediada por VPS4. En la citoquinesis tardía, ANCHR y CHMP4C retienen a Vps4 en el cuerpo medio. Cuando se produce la desactivación de Aurora B, se produce la desfosforilación de CHMP4C lo cual resulta en la disociación del complejo ternario ANCHR-CHMP4C-Vps4. Esta liberación podría permitirle a Vps4 migrar al sitio de abscisión para ejercer su acción sobre ESCRT-III (Thoresen et al., 2014).

Además de los mecanismos hasta aquí descritos (Carlton & Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007), se introdujo otro modelo de regulación de la abscisión por tensión de las membranas que involucra a ESCRT-III. Según el mismo, la tensión del puente intercelular modula la activación y la formación de los polímeros de ESCRT-III. Específicamente, se propuso que la alta tensión de la membrana resultante de las altas fuerzas de tracción sobre el puente intercelular inhibe el reclutamiento y ensamblaje de ESCRT-III (Lafaurie-Janvore et al., 2013). Este modelo, se asocia con el tráfico vesicular y la contribución de membranas. Al respecto, en células *HeLa* se ha descrito que las caveolas limitan la tensión del puente intercelular y favorecen la abscisión debido a que poseen la capacidad de aplanarse, proporcionar membrana adicional y amortiguar la tensión de la membrana plasmática previniendo su ruptura (Andrade & Echard, 2022; Del Pozo et al., 2021; Gervásio et al., 2011; Sinha et al., 2011).

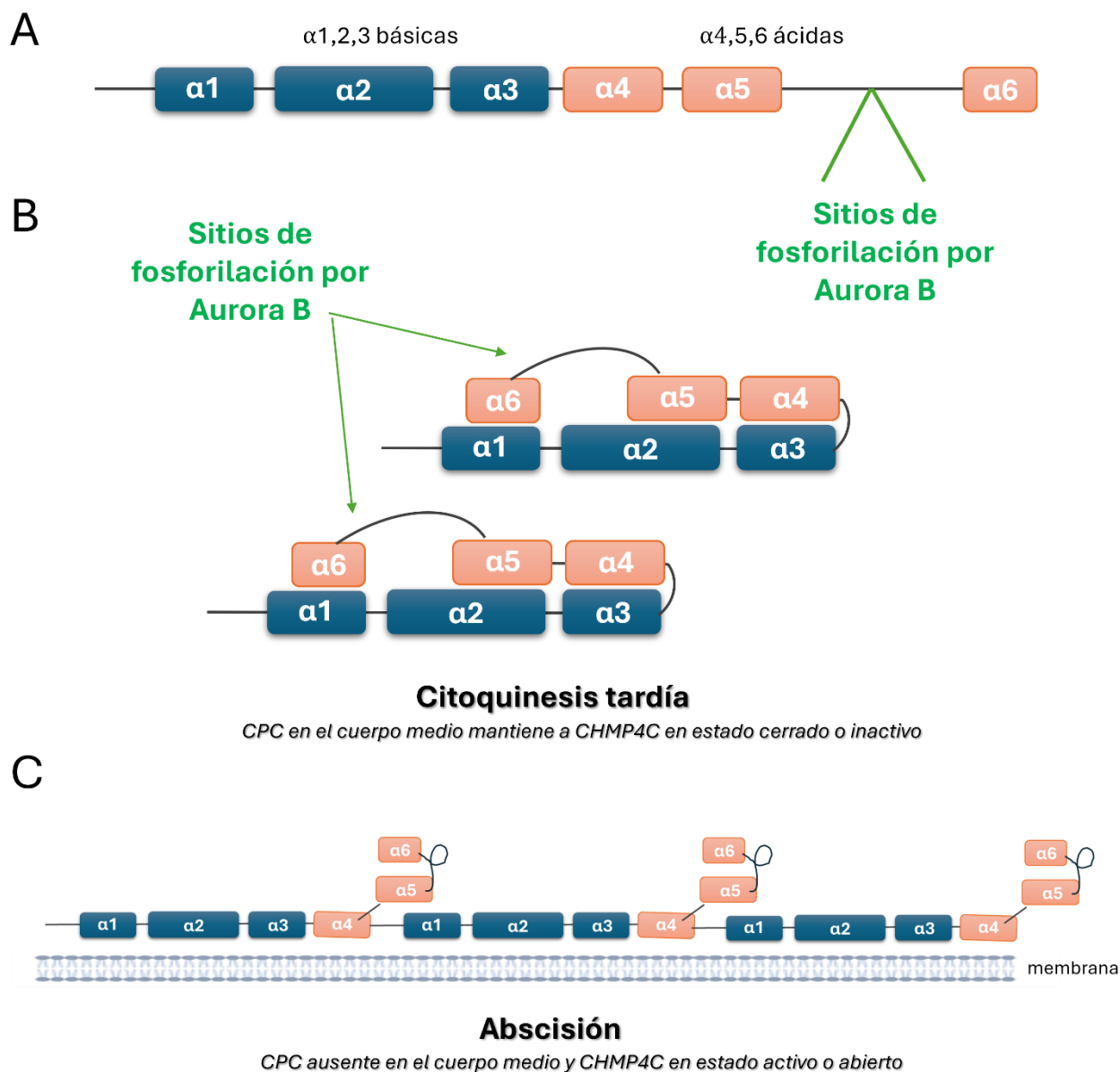


FIGURA 30. Regulación de CHMP4C por Aurora quinasa B durante la citoquinesis. A. Esquema de CHMP4C que indica la posición de los sitios *target* de fosforilación por parte de Aurora B. La interacción con Borealina y la fosforilación por Aurora B mantienen a CHMP4C en su estado "cerrado" en el cuerpo medio antes de la abscisión. C. Cuando CPC ya no está en el cuerpo medio, CHMP4C cambia su configuración espacial a un estado "abierto" y formar polímeros asociados a la membrana que median la abscisión (Esquema adaptado de Capalbo, 2012).

Se ha descrito que, durante la citoquinesis, las caveolas se localizan en el cuerpo medio y en los puntos de entrada (*Entry Points* o EP) (**FIGURA 31**), definidos como la interfaz entre el

punto de entrada y ambos cuerpos celulares, controlando la tensión de las membranas (Andrade et al., 2022). De esta manera, la presencia de las caveolas disminuye la tensión de las membranas y consecuentemente, se produce el reclutamiento de ESCRT-III (Andrade et al., 2022; Andrade & Echard, 2022) (**FIGURA 31**). De hecho, se ha reportado que la pérdida completa de caveolas en el cuerpo medio y en el sitio de abscisión, conduce a la binucleación de las células y al retraso de la abscisión por la polimerización defectuosa de ESCRT-III (Andrade & Echard, 2022).

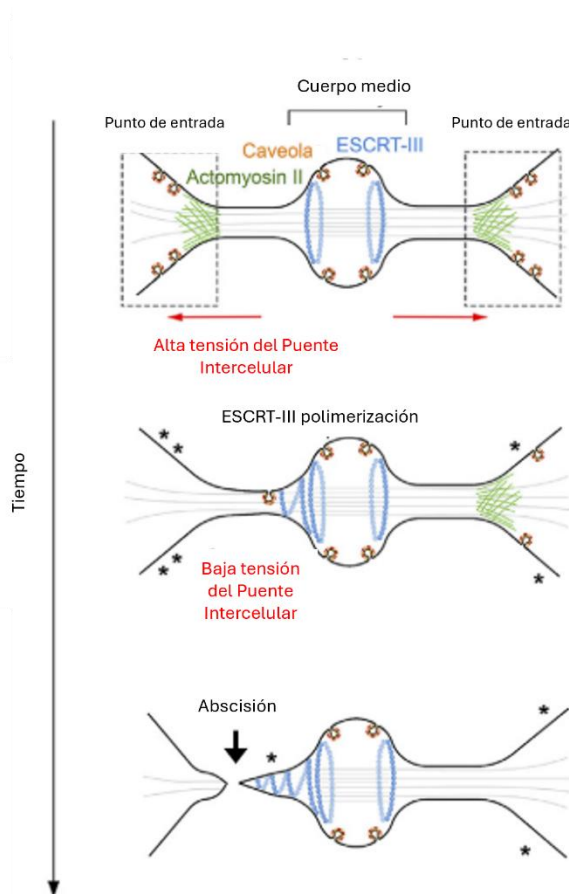


FIGURA 31. Modelo de las caveolas regulando la tensión de ICB y la polimerización de ESCRT-III al sitio de abscisión. Nótese la desaparición progresiva de las caveolas (donde se representan los asteriscos), posiblemente por aplanamiento, en los puntos de entrada mientras las células progresan hacia la abscisión. Se propone que este aplanamiento de la membrana contribuye a una disminución de la tensión del Puente Intercelular (ICB), lo que promueve la polimerización de ESCRT-III y la abscisión por parte de CHMP4. *Entry Point*: Punto de entrada. Adaptado de Andrade et al., 2022.

Tal como se ha mencionado a lo largo de este capítulo, la composición de las membranas regula el flujo endocítico y exocítico, y, asimismo, la composición lipídica influye en los

cambios de la tensión de las membranas. Por lo tanto, la tensión o la deformabilidad de la bicapa lipídica puede ser controlada por la presión osmótica, la presencia de invaginaciones de membrana (como caveolas) y por la exocitosis y endocitosis (Sens & Plastino, 2015). De esta manera, el transporte vesicular es parte responsable de los cambios de composición lipídica y de la tensión de las membranas, lo cual influye en el reclutamiento de los componentes de ESCRT. Este mecanismo puede observarse en la **FIGURA 31**. En el puente intercelular es sentido el cambio de tensión de la membrana, por lo que las caveolas se dirigen a este sitio para disminuir la tensión del puente intercelular, al tiempo que modulan la activación y polimerización de ESCRT-III. En este mecanismo también se ha descrito la participación de la Aurora B. Esta quinasa, cuando transloca a la parte central del cuerpo medio, estabiliza el puente intercelular a través de la polimerización de la actina. Esta polimerización de la actina aumenta la tensión de la membrana, por lo que, paralelamente, se inhibe el reclutamiento y polimerización de CHMP4 (Capalbo et al., 2012, 2016; Thoresen et al., 2014). En conclusión, la reducción de la tensión del puente intercelular es uno de los eventos *upstream* más importante que desencadena la localización de ESCRT-III en el sitio.

5.6.3 Tráfico vesicular y citoquinesis

El transporte de vesículas juega un papel crucial durante la citoquinesis, particularmente para la integridad del puente intercelular durante la abscisión, ya que las mismas transportan proteínas esenciales y membranas que son utilizadas no sólo para garantizar el proceso de abscisión, sino para remodelar y reparar las membranas luego del corte. Para ello, estas vesículas viajan y se fusionan con áreas específicas de la membrana plasmática, previo a la completa separación celular (Albertson et al., 2005; Frémont & Echard, 2018). Las vesículas derivan del aparato de Golgi, de los endosomas de reciclaje y parten de la vía secretoria general.

Desde hace unos años es más evidente que la citoquinesis depende de la estrecha cooperación entre los elementos del citoesqueleto y las membranas lipídicas; de misma manera, mucho más se sabe sobre el tráfico de vesicular y su rol fundamental en la citoquinesis de células

animales. Ya en la década de 1930 se habían observado vesículas de un reservorio citoplasmático insertadas en el surco entre las dos células en división y se propuso que las mismas podían impulsar la fase de división de la citoquinesis (Frémont & Echard, 2018; Schetman, 1937). Actualmente, se reconoce el rol fundamental del tráfico vesicular en la formación del surco (Frémont & Echard, 2018). En humanos, la existencia de vesículas de membrana dentro del puente intercelular se informó mediante microscopía electrónica (EM) y, si bien la mayoría de las vesículas parecen derivar de los endosomas de reciclaje, también se han detectado vesículas derivadas del Golgi y de los endosomas tempranos (Frémont & Echard, 2018; Mullins & Bieselee, 1977a, 1977b) (**FIGURA 32**).

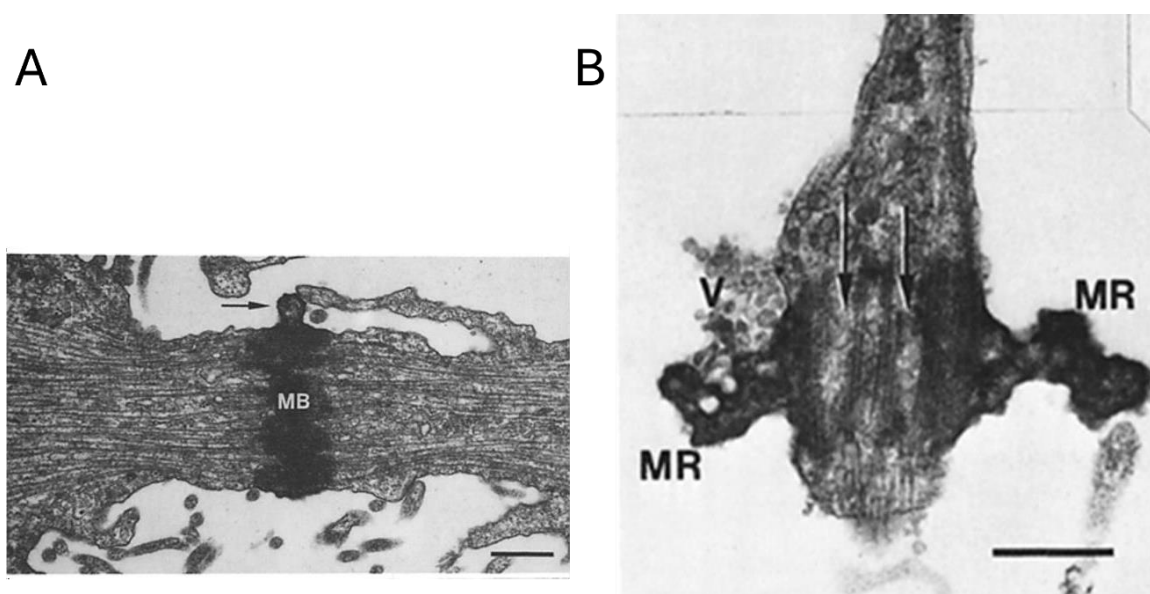


FIGURA 32. A. Puente intercelular y cuerpo medio (MB) fijados poco después de la telofase. Los microtúbulos están ausentes en la pequeña cresta del cuerpo medio (flecha). Bar 0,5 μ m x 22200 (Mullins & Bieselee, 1977b). **B.** Pequeñas vesículas (V) se agrupan cerca de la gran cresta en la parte del cuerpo medio (MR). Las flechas indican los canales citoplasmáticos a través de la parte media del cuerpo. MR: cuerpo medio. Barra, 0,5 μ m. x 24.500 (Mullins & Bieselee, 1977b).

Se ha reportado que la perturbación del tráfico vesicular durante la citoquinesis altera la estabilidad del puente intercelular (Frémont & Echard, 2018). Durante la citoquinesis, las vesículas generadas se dirigen hacia la región del cuerpo medio proporcionando membrana adicional para el proceso de abscisión, dado que, conforme el anillo contráctil de actina y miosina se estrecha, la membrana plasmática requiere una expansión compensatoria de la superficie de la membrana (Frémont & Echard, 2018; Mullins & Bieselee, 1977a). Las vesículas

son transportadas hacia la región de abscisión mediante elementos del citoesqueleto, quinesinas y dineínas, y una vez en el cuerpo medio, se fusionan con la membrana del puente intercelular (Zhu et al., 2005). En este contexto, las vesículas que transportan proteínas regulatorias esenciales para la abscisión se fusionan con la membrana para facilitar esta elongación. Por lo tanto, las vesículas sirven como *carriers* de proteínas ESCRT y otros factores involucrados en la remodelación y escisión de la membrana. Asimismo, participan en la reparación de la membrana ya que, durante la citoquinesis se puede provocar discontinuidades o daños locales.

Aquellas vesículas transportadoras del complejo ESCRT al cuerpo medio durante la citoquinesis son principalmente vesículas derivadas de las rutas endocíticas y de reciclaje. Debido a que el sistema endocítico constituye el origen de estas vesículas, las mismas presentan una dotación específica de proteínas Rab GTPasas, que controlan el tráfico vesicular en el contexto de la citoquinesis: Rab11 y Rab35 (Pust et al., 2023) (**FIGURA 33**). Además, Rab35 regula el tráfico de vesículas que contienen los componentes del complejo ESCRT-III (Schiel & Prekeris, 2013). En suma, la citoquinesis es regulada a través de la biogénesis y el tráfico vesicular, procesos que aseguran el suministro de membranas y proteínas necesarias para la remodelación del cuerpo medio y la abscisión (Frémont & Echard, 2018).

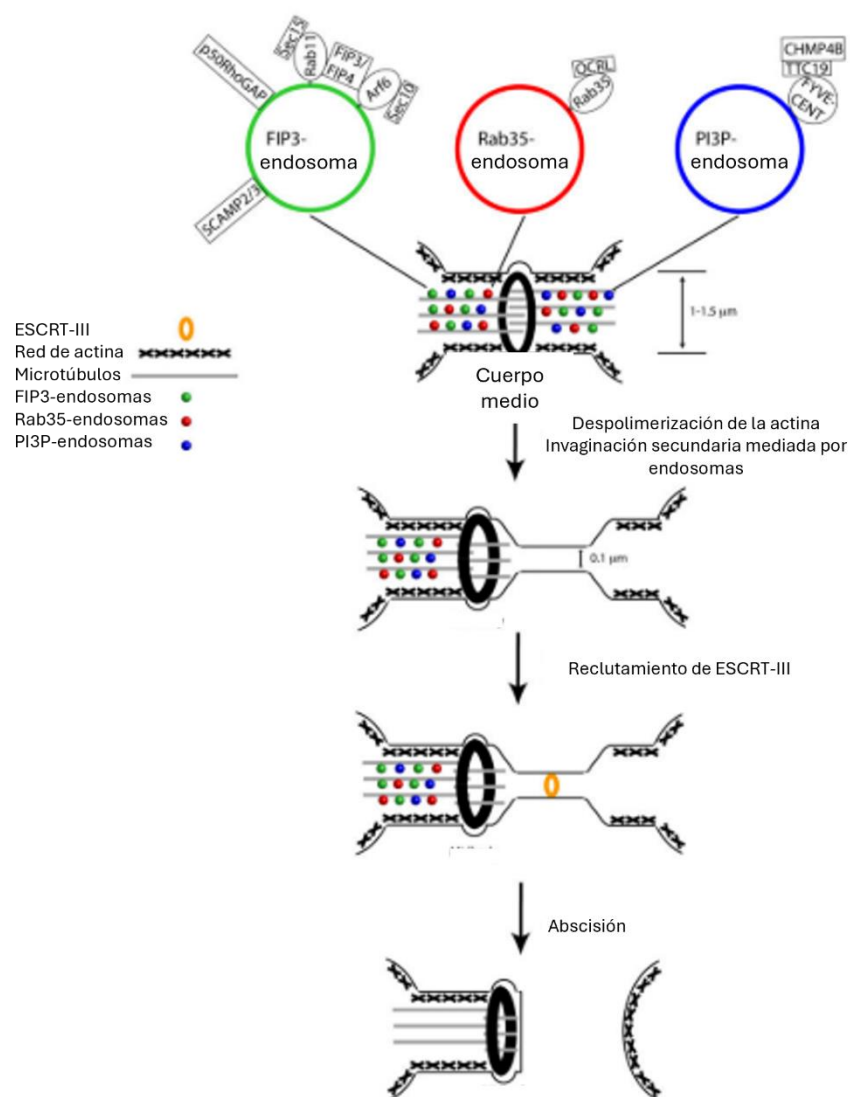


FIGURA 33. El modelo describe los dos mecanismos propuestos para regular la abscisión. En la citoquinesis tardía, el puente intercelular estabilizado por actina contiene tres tipos de endosomas: endosomas asociados a FIP3 (FIP3-endosomas en verde), endosomas asociados a Rab35 (Rab35-endosomas en rojo) o endosomas enriquecidos con PI3P (azul). Los endosomas median la despolimerización de la actina en el puente intracelular y el estrechamiento del puente. Este delgado puente luego es reconocido por CHMP4B que marca el sitio de abscisión y corta la membrana plasmática completando la citoquinesis (Schiel & Prekeris, 2013).

5.6.4 Ciclo Celular en *T. brucei* PCF

En tripanosomátidos se describe una estricta regulación del posicionamiento de ciertos orgánulos a lo largo del ciclo celular. Y las dimensiones de kinetoplasto-núcleo y kinetoplasto-parte posterior se encuentran fijas durante el ciclo celular de *T. brucei* PCF. Asimismo, durante la división celular, el cuerpo del parásito incrementa su longitud y su diámetro al mismo tiempo que el nuevo flagelo se alarga. Esto es posible gracias a la extensión de los microtúbulos subpelliculares en el extremo posterior de la célula y a la inserción de nuevos microtúbulos entre los microtúbulos viejos (Vaughan & Gull, 2008).

A diferencia de muchos otros eucariotas, algunas estructuras subcelulares tales como la mitocondria, el RE, el Golgi y el flagelo están presentes en una sola copia en células en la fase G1, y se replican en momentos definidos de la división celular (Archer et al., 2011; Matthews, 2005) (**FIGURA 34**). De hecho, la duplicación del núcleo y el kinetoplasto son eventos independientes.

En la fase G1 temprana, las células poseen un metabolismo activo focalizado en la síntesis proteica, exhiben un núcleo, el kinetoplasto, cuerpo basal, el pre-cuerpo basal, la mitocondria y el flagelo, el cual emerge desde el extremo posterior de la célula y se extiende a lo largo de la longitud del parásito hacia la cara anterior. En la fase G1 tardía, el pre-cuerpo basal madura a un nuevo cuerpo basal que se localiza en la base del nuevo flagelo (F), al tiempo que el kinetoplasto se encuentra en la fase S. Para este momento la célula consiste en 1 núcleo y 1 kinetoplasto (1N1K). Para el final de la fase G1, el parásito posee una configuración 1N2K1F. En la fase S, los kinetoplastos y los cuerpos basales comienzan a separarse al tiempo que el nuevo flagelo comienza a elongarse anclado al viejo flagelo. De esta manera, finalizada la fase S el parásito presenta un núcleo, dos kinetoplastos, dos flagelos y dos cuerpos basales (1N2K2F). En la fase G2, tras la replicación del ADN nuclear, se forma el huso mitótico intranuclear que sirve como indicador del inicio de la mitosis (2N2K). Uno de los dos núcleos se posiciona entre ambos kinetoplastos asegurando, de esta manera, dos "grupos" de orgánulos citoplasmáticos listos para la escisión (Vaughan & Gull, 2008) (**FIGURA 34**). La envoltura nuclear se mantiene durante la mitosis y el CPC se traslada desde el huso mitótico

previo a la citokinesis. Ya durante la citokinesis, el CPC se mueve junto al surco (línea de puntos) desde la zona anterior hacia la zona posterior (Archer et al., 2011). De esta manera, al finalizar la mitosis, se forman dos células cada una con un núcleo, un kinetoplasto y un flagelo.

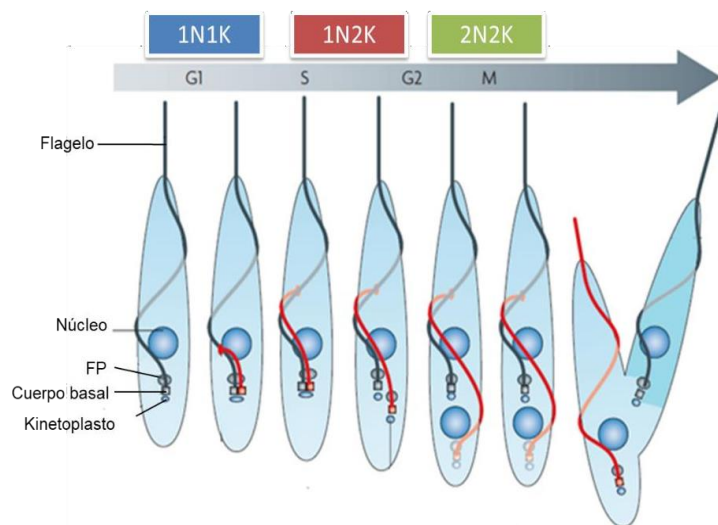
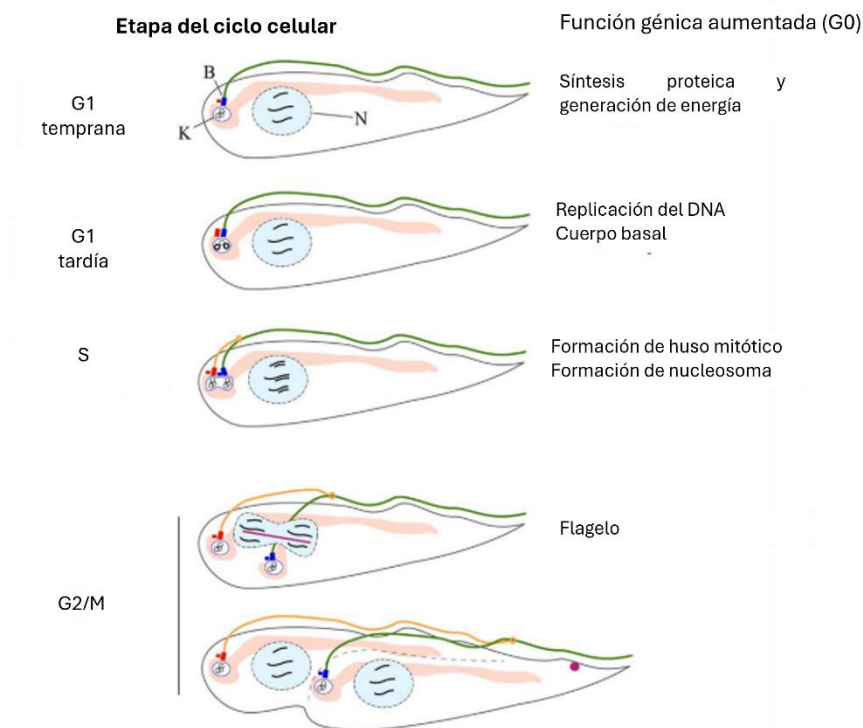


FIGURA 34. Representación de células *T. brucei* PCF progresando a través del ciclo celular. Antes de la citokinesis, el CPC se reubica desde el huso a la parte anterior de la célula (círculo rosa, panel inferior) donde se mueve con el surco de anterior a posterior (línea de puntos). K: el kinetoplasto (K). N: núcleo. B: cuerpo basal (rectángulo azul) y pre-cuerpo basal (rectángulo rojo), mitocondrión (rosa); antiguo flagelo (verde), que emerge del extremo posterior de la célula (izquierda) pero está atado al lado dorsal de la célula

a lo largo de su longitud. Esquemas extraídos de (Archer et al., 2011; Field & Carrington, 2009)



5.6.4.1 Citoquinesis en *T. brucei*: rol del corset subpelicular

En *T. brucei*, la citoquinesis no depende de un anillo contráctil de actomiosina, sino de la reorganización de los microtúbulos del corset subpelicular. La reorganización de los microtúbulos durante la citoquinesis es un proceso complejo que involucra la coordinación de la despolimerización y redistribución local de microtúbulos para permitir la formación del surco de división, guiado por el crecimiento del flagelo y asistido por el tráfico vesicular (Sinclair et al., 2021). El surco de división se inicia en la parte posterior de la célula (cerca de la región del flagelo) y progresa hacia adelante. A medida que este surco avanza, los microtúbulos del corset subpelicular se desplazan de manera de permitir la invaginación de la membrana plasmática y la constricción del cuerpo celular. Este proceso se lleva a cabo por mecanismos de despolimerización y reorganización local de algunos microtúbulos en la región de división, mientras que la mayor parte de los microtúbulos del corset permanecen intactos para mantener la forma y el citoesqueleto íntegro de las células hijas (Hammarton et al., 2007). En *T. brucei*, la formación del surco de división también se ve influenciada por el nuevo flagelo y el FAZ asociado. Ambas estructuras definen la posición y la dirección de entrada del surco, lo que también determina el eje de corte de ambas células hijas. El surco queda dispuesto entre el viejo y el nuevo flagelo y cada célula hija posee su flagelo apuntando en sentido opuesto al del otro. Luego, el batido de los flagelos provocaría una fuerza mecánica necesaria para la escisión final de ambas células.

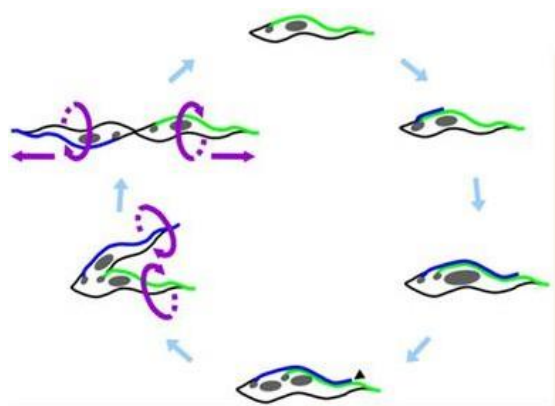


FIGURA 35. Esquema del ciclo celular de la forma procíclica de *T. brucei*. Principales etapas del ciclo celular y se detalla la separación de las células durante la citoquinesis. Las flechas violetas esquematizan el movimiento de los flagelos y el sentido opuesto de la fuerza que éste ejerce. Esquema modificado de Ralston & Hill, 2008.

5.6.5 Puntos de control del ciclo celular de *T. brucei*

T. brucei PCF carece de un punto de control entre la mitosis y la citoquinesis o se presume que son capaces de saltar este punto de control. Por lo tanto, aun cuando la mitosis se ve afectada por una intervención química, la forma procíclica es capaz de completar la citoquinesis. Por lo tanto, en *T. brucei*, la configuración 2N2K es el primer tipo celular que se acumula cuando la citoquinesis se encuentra alterada (Hammarton et al., 2007). También es muy curioso que un error en la replicación del ADN nuclear no impide la citoquinesis (Akiyoshi & Gull, 2013), mientras que la inhibición de la duplicación del cuerpo basal o de su segregación producen el arresto y se bloquea la citoquinesis (Li, 2012).

En la forma sanguínea, en cambio, el bloqueo en la mitosis inhibe la citoquinesis, pero las sucesivas rondas de síntesis del ADN nuclear o la replicación y segregación del kinetoplasto no bloquean la citoquinesis. De esta manera, se generan células gigantes de ADN poliploide que no son capaces de separarse (Jones et al., 2014). Además, la citoquinesis es inhibida por defectos en la duplicación del cuerpo basal, el flagelo o el Golgi como así también cuando se reduce la disponibilidad de VSG en la superficie celular (Hammarton et al., 2007).

En *T. brucei* PCF, la Aurora quinasa AUK1 ha sido identificada como iniciadora de la citoquinesis. Se han identificado tres genes que codifican para Aurora B quinasa, sin embargo, a través de varios ensayos se demostró que sólo un gen TbAUK1 es un gen funcional, al menos en el estadio PCF (Tu et al., 2006). TbAUK1 fue involucrada en el ensamblaje del uso mitótico y fue definido por los autores como un ortólogo de la Aurora B humana. En el caso de *T. brucei* BSF, a TbAUK1 no se le pudo atribuir el rol de iniciadora de la citoquinesis debido a que, en este estadio, la inhibición de la mitosis previene la citoquinesis.

Tal como se ha descrito en células de mamífero, *T. brucei* presenta un CPC compuesto por la quinasa Aurora B y otras proteínas conservadas. Sin embargo, el mismo expresa un CPC inusual que consiste básicamente en TbAUK1 y dos proteínas específicas del kinetoplasto: TbCPC1 and TbCPC2 (Hu et al., 2014; Li, 2012). El CPC en *T. brucei*, con TbAUK1 como componente central, regula la división celular mediante la fosforilación de proteínas del huso mitótico, la reorganización de microtúbulos del corset subpelicular y la facilitación del tráfico

vesicular en la zona de división.

5.6.6 Citoquinesis y Transporte vesicular en *T. brucei*

Es evidente la relación entre el transporte vesicular, la composición de las membranas y la citoquinesis. En *T. brucei* BSF, los ensayos que involucraron el silenciamiento génico de VSG mediante RNAi mostraron células de fenotipo 2N2K sin surco de ingreso formado, sugiriendo el arresto pre-citoquinesis. Por lo tanto, los autores destacaron la posibilidad de que las células BSF hayan desarrollado un nuevo punto de control que detecta la falla de la síntesis de VSG para garantizar que las células no se dividan en ausencia de una protección adecuada de la superficie celular (Hammarton et al., 2007). Respecto a la dotación molecular de la superficie celular, se ha descrito que la síntesis de fosfoinosítidos resulta esencial para la división del parásito, proveyendo algunas de las primeras evidencias de la incidencia de las vías de señalización de los fosfoinosítidos sobre la regulación de la citoquinesis (Rodgers et al., 2007). De hecho, los autores demostraron que la síntesis de PI4P (fosfatidilinositol-4-fosfato) por la enzima TbPI4KIII (*Phosphatidylinositol 4-kinase III-beta*) es esencial para el crecimiento y la morfología normal de *T. brucei* PCF al tiempo que se reveló que esta quinasa es esencial para el mantenimiento de la estructura del Golgi, el transporte de proteínas, la forma celular normal y la citoquinesis. La importancia de los fosfoinosítidos en el transporte vesicular y la citoquinesis, también se ilustra con el hallazgo de que la depleción de TbVps34, una fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III, causa un defecto en la exportación de VSG a la superficie celular, además de su efecto sobre la segregación del Golgi (Hall et al., 2006).

En nuestro laboratorio se ha caracterizado la proteína serina treonina quinasa TbVps15, habiéndosele asignado un rol en el mantenimiento de la citoquinesis, la endocitosis y el transporte intracelular (Schoijet et al., 2018). En estos estudios se registró que las células *knockdown* RNAiTbVps15 poseían su capacidad de crecimiento inhibida y el bloqueo de la citoquinesis. Asimismo, se evidenció que TbVps15 forma un complejo con TbVps34, tal cual como ocurre en levaduras (Schoijet et al., 2018). A partir de todo ello, se puede evidenciar que hay un punto en común entre estas proteínas: los componentes de las membranas, el transporte de moléculas y la citoquinesis. Si bien no hay estudios que vinculen directamente

la presencia de vesículas en el surco de ingreso con la citoquinesis en estos organismos, hay autores que consideran la probable necesidad de la remodelación del citoesqueleto y de la membrana gracias a la posible acumulación de proteínas en el punto de unión entre las células hijas, producto del transporte vesicular. Este proceso sería análogo a la acumulación de proteínas que ocurren en el cuerpo medio de las células de mamífero (Hammarton et al., 2007). Hay que destacar también, que una parte fundamental es la relación del tráfico vesicular con los microtúbulos del corset subpelicular ya que guían el transporte de vesículas hacia el sitio de división, facilitando la expansión de la membrana y la separación de las dos células hijas. Este proceso es fundamental para asegurar que ambas células reciban el material necesario para formar membranas completas y funcionales, además de asegurar la distribución de organelos como el núcleo y el kinetoplasto.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

- La proteína Vps32 de los tripanosomátidos, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, participa en los mecanismos de transporte intracelular mediados por vesículas.
- La proteína Vps32 de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* participa en el ciclo celular de ambos tripanosomátidos.
- Las características estructurales de la proteína Vps32 se encuentran conservadas en ambos Tripanosomátidos y la proteína posee la capacidad de alternar entre estados conformacionales.

OBJETIVOS

Nuestro objetivo general es evaluar la funcionalidad y relevancia del transporte intracelular en el ciclo de vida de ambos tripanosomátidos, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*. Particularmente, nuestro objetivo se centra en el estudio de la proteína Vps32, elucidación de los mecanismos de transporte mediado por vesículas y su relación con la regulación del ciclo celular en *T. brucei* y *T. cruzi*.

Para cumplir con este objetivo general se estudiará a la proteína Vps32 abordando los siguientes objetivos particulares:

1. Iniciar la caracterización funcional de Vps32 de *T. cruzi* mediante su sobreexpresión en la forma epimastigote del parásito y posterior análisis fenotípico.
2. Utilización del modelo de *T. cruzi* para el estudio de delección sistemática de dominios de la región C-terminal de Vps32 e impacto sobre la estructura, funcionalidad de la proteína y localización subcelular.
3. Iniciar la caracterización funcional de Vps32 de *T. brucei* mediante el silenciamiento de su expresión génica y la sobreexpresión inducida en la forma procíclica y sanguínea del parásito e impacto de la proteína sobre los procesos claves del ciclo celular.
4. Determinar el patrón de expresión de Vps32 (monómero, polímero) y la localización subcelular de Vps32 de *T. brucei* y *T. cruzi*.

5. Determinar la participación de Vps32 en el transporte endocítico hacia el lisosoma.
6. Determinar la participación de Vps32 en el ciclo celular y, específicamente, si posee una incidencia en la citoquinesis y en algún punto de control del ciclo celular relacionado.
7. Evaluar las características particulares de la estructura secundaria de Vps32 y sus regiones regulatorias. Asimismo, determinar la estructura tridimensional de la proteína *in silico* para evaluar la conservación estructural de la región N-terminal (NTR) y la divergencia característica de la región C-terminal (CTR), como así también la dinámica general de la proteína.

Adicionalmente, considerando que los objetivos previamente expuestos podrían aportar información sobre procesos clave en estos tripanosomátidos, nos proponemos como objetivo complementario identificar nuevos blancos terapéuticos potenciales para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos organismos complejos.

Materiales y métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1- CULTIVOS BACTERIANOS

Cepas de *Escherichia coli*

- E. coli DH5 α F': F'/endA1 hdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 (Nal^I) relA1 Δ (lacZ YA-argF) _{U169} (m80lacZ Δ M15).

Medios de cultivo de bacterias:

LB: bacto-triptona 1% p/v; extracto de levaduras 0,5% p/v; NaCl 1% p/v.

LB-agar: LB + agar 1,5% p/v.

Antibióticos y soluciones

- Ampicilina: preparación de stock a partir de droga sólida a una concentración de 100 mg/mL en agua. La concentración final a utilizar es 100 μ g/mL.
- kanamicina: la concentración a utilizar es de 50 μ g/mL
- Cloranfenicol: La concentración final a utilizar 34 μ g/mL (en etanol)
- X-gal: desde la solución stock 50 mg/mL, (en dimetilformamida), se agregaron 50 μ L/placa (concentración final p/placa: 40 μ g/mL)

2- CULTIVOS DE PARASITOS

Cepas de *Trypanosoma brucei*

Estadio procíclico (PCF): cepa 29-13 (Wirtz et al., 1999).

Estadio sanguíneo (BSF): cepa SM (Single Marker, Cross, 2014).

Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Estadio epimastigote: cepa Y

Medios de cultivo de parásitos

LIT (*T. cruzi* epimastigote): Liver Infusion (Difco) 0,5% P/V; triptosa 0,5% P/V; NaCl 0,4% (m/v); KCl 0,04% P/V; Na₂HPO₄ 0,8% P/V, ajustar el pH a 7,2. Agregar hemina 0,02 mg/mL; suero fetal bovino 10% v/v, estreptomycin 100 μ g/mL y penicilina 100 U/mL.

SMD-79 (*T. brucei* procíclico): medio SMD-79 (Bioscience) suplementados con 10% de SFB sin Tetraciclina, 25 μ g/mL G418, 50 μ g/mL higromicina y hemina 0,002%.

HMI-11 (*T. brucei* sanguíneo): Iscore's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen) (Piruvato de sodio 100 mg/L, Hipoxantina 136,1 mg/L, Timidina 38,7 mg/L, ácido bathocuproine sulfónico 28,22 mg/L, L- cisteína 181,8 mg/L, Carbonato de sodio 3,024 mg/L, 2-mercaptoetanol 196 µM) suplementado con 10% v/v de SFB; Higromicina 2.5mg/mL; Neomicina 1.25mg/mL.

Antibióticos

Zeocina (*T. brucei* estadio procíclico): preparación de stock de 100 mg/mL, la concentración a utilizar 20 µg/mL

G418 (*T. cruzi* estadio epimastigote): concentración final a utilizar 100 µg/mL

Blasticidina: 10 µg/mL (*T. brucei* BSF), 5 µg/mL (*T. brucei* PCF).

Tetraciclina: 0,5 µg/mL (*T. brucei* sanguíneo), 1 µg/mL (*T. brucei* PCF).

3- Soluciones generales

3.1- Soluciones empleadas en técnicas de ADN y ARN

Buffer TE 10 X: Tris-HCl 0,1 M pH 8,00; EDTA 10 mM.

TAE 50 X: Tris base 24,2% (m/v); ácido acético glacial 5,71% (v/v); EDTA 50 mM pH 8,00.

Solución 1: Tris-HCl 25 mM pH 8,00; EDTA 10 mM; glucosa 50 mM.

Solución 2: NaOH 0,2% (m/v); SDS 1% (m/v).

Solución 3: KCH₃CO₂ 3 M. Ajustar pH a 5,20 con ácido acético glacial.

PIC: fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).

Buffer MOPS 10 X: MOPS 0,2 M; NaCH₃CO₂ 80 mM pH 7,00; EDTA 10 mM.

H₂O DEPC: agua hexadestilada con di-etilpirocarbonato 0,1% v/v. Se agitó durante toda la noche y al día siguiente se autoclavó dos veces.

Buffer de siembra para muestras de RNA: 46 µl de la siguiente mezcla cada 30 µl de muestra de ARN. Mezcla: 6 µl MOPS 10x, 30 µl formamida desionizada, 9 µl formaldehído, 1 µl de Bromuro de Etidio (BrEt) 1mg/mL.

Buffer de siembra para muestras de ADN, 6x: azul de bromofenol 0,25% p/v; Xylene Cyanol 0,25% p/v; y glicerol 30% v/v.

Solución de lisis de bacterias: Tris-HCl 50 mM pH 8; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM pH 8;

fenilmetilsulfonil fluorato (PMSF) 1 mM

3.2- Soluciones empleadas en técnicas de proteínas

Buffer PBS 10 X: NaCl 8% (p/v); KCl 0,2% (p/v); Na₂HPO₄ 1,4% (p/v); KH₂PO₄ 0,2% (p/v).

Buffer TBS 10 X: Tris-HCl 0,5 M pH 7,40; NaCl 1,5 M.

TBS-T: Buffer TBS 1 X; Tween 0,05% (v/v).

Tris-Glicina 10X: Tris base 0,25 M; glicina 1,92 M.

Buffer de corrida en SDS-PAGE: Tris-Glicina 1 X; SDS 0,1%.

Buffer de electrotransferencia de proteínas: Tris-Glicina 1 X; metanol 20%.

Solución de bloqueo en Western blot: TBS-T 1 X; leche descremada en polvo 5%.

Rojo Ponceau S: Rojo Ponceau S 0,5 % (p/v); metanol 40%; ácido acético 10%.

Azul Coomassie para tinción de SDS-PAGE: Coomassie R-250 0,1% (m/v); metanol 50% (v/v); ácido acético 10% (v/v).

Solución de desteñido SDS-PAGE: Metanol 45% (v/v); ácido acético 10% (v/v).

Azul Coomassie coloidal: Metanol 18% (v/v); (NH₄)₂SO₄ 17% (p/v); H₃PO₄ 2% (v/v); Coomassie Blue G-250 0,5 g/L.

Buffer de siembra para proteínas 5X: Tris-HCl 0,3 M pH 6,80; SDS 10% (p/v); glicerol 50% (v/v); azul de bromofenol 0,002% (p/v); DTT 0,15 M.

Solución de Tripsina: Tripsina 0,25% en buffer HANK's.

Mezcla 30% acrilamida: acrilamida 29% (p/v); N, N'-metilenbisacrilamida 1% (p/v).

Solución para preparar geles resolutivos para SDS-PAGE con Tris-glicina: cantidad necesaria de mezcla 30% acrilamida; Tris pH 8,80 0,375 M; SDS 0,1% (m/v); persulfato de amonio 0,1% (p/v); TEMED 0,04% (v/v).

Solución para preparar geles concentradores 5% para SDS-PAGE con Tris-glicina: mezcla 30% acrilamida 17% (v/v); Tris pH 6,80 0,13 M; SDS 0,1% (p/v); persulfato de amonio 0,1% (p/v); TEMED 0,1% (v/v).

3.3- Soluciones empleadas en técnicas de parásitos

Buffer de lisis para extracción de ADN: Tris 0.01 M pH 8; EDTA 0.2 M; SDS 1% (v/v).

Buffer de lisis para extractos proteicos: Tris-HCl 50 mM, pH 8; 2-mercaptoetanol 10 mM; glicerol 10% (v/v); NaCl 150 mM, Tritón X100 0,5% (v/v); EDTA 10 mM; NP-40 0,2%.

Buffer de lisis hipotónico: HEPES- KOH 0,02 M pH 7,6; DTT 2 mM o 2-mercaptoetanol 4mM.

Buffer de electroporación: PBS 1X; MgCl₂ 0,5mM; CaCl₂ 0,1mM.

Solución de bloqueo en Inmunofluorescencia: PBS 1 X; BSA 1% (m/v).

PBS-EDTA 2 mM: EDTA 0,5M; PBS 1X.

Solución de Tinción: PBS-EDTA; RNAasa 2µg/mL; Ioduro de Propidio 50 µg/mL.

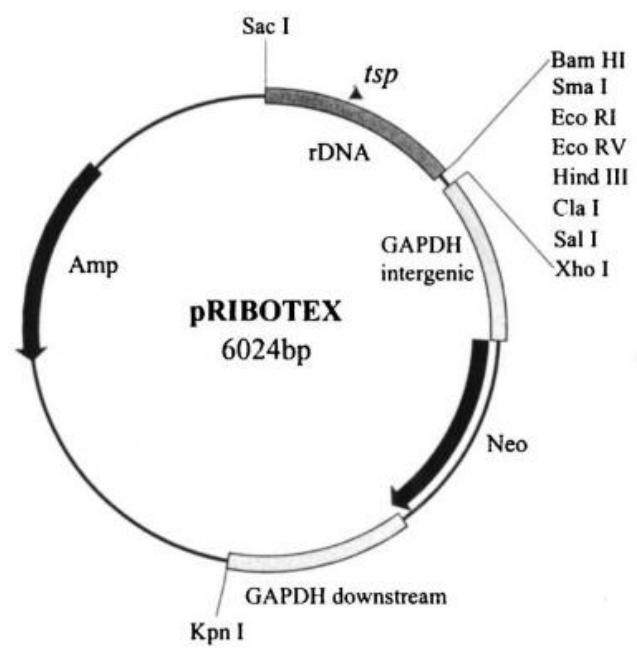
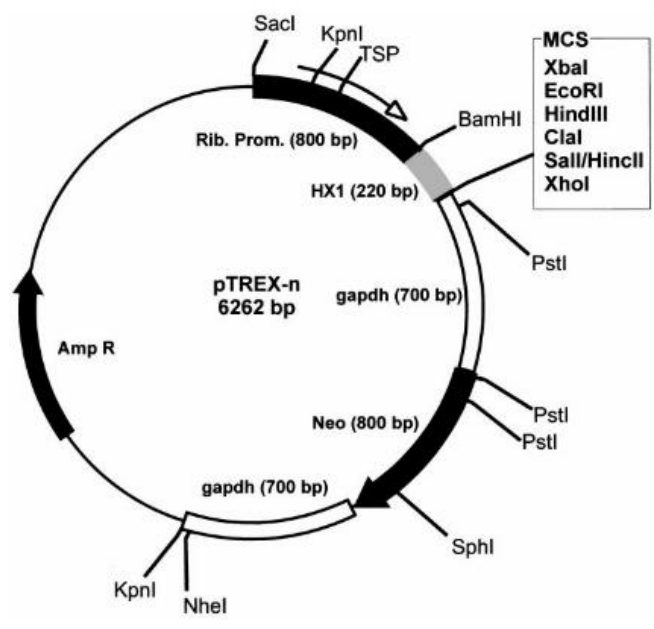
Buffer Hank (gHBSS): 137 mM NaCl; 5,4mM KCl; 0,25 mM Na₂HPO₄; 0,44 mM KH₂PO₄; 1,3 mM CaCl₂; 1 mM MgSO₄; 4,2 mM NaHCO₃; 1 g/L Glucosa.

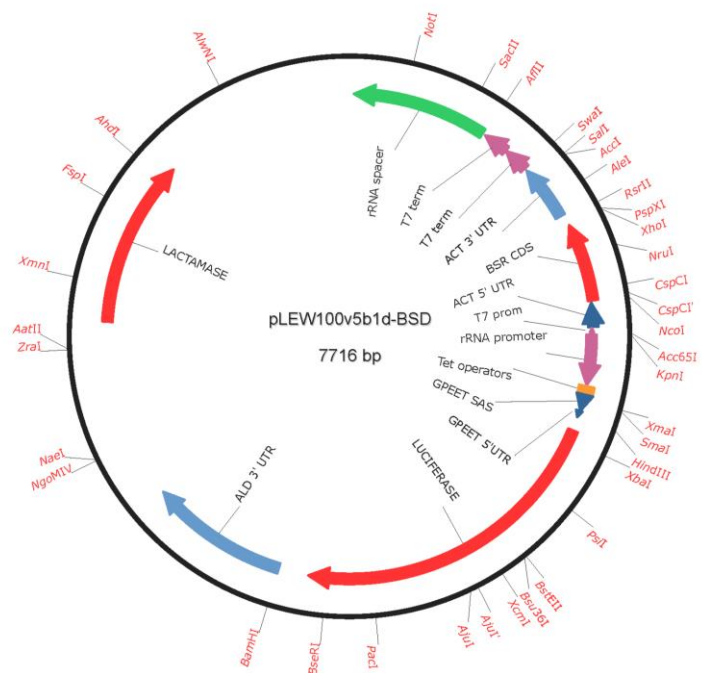
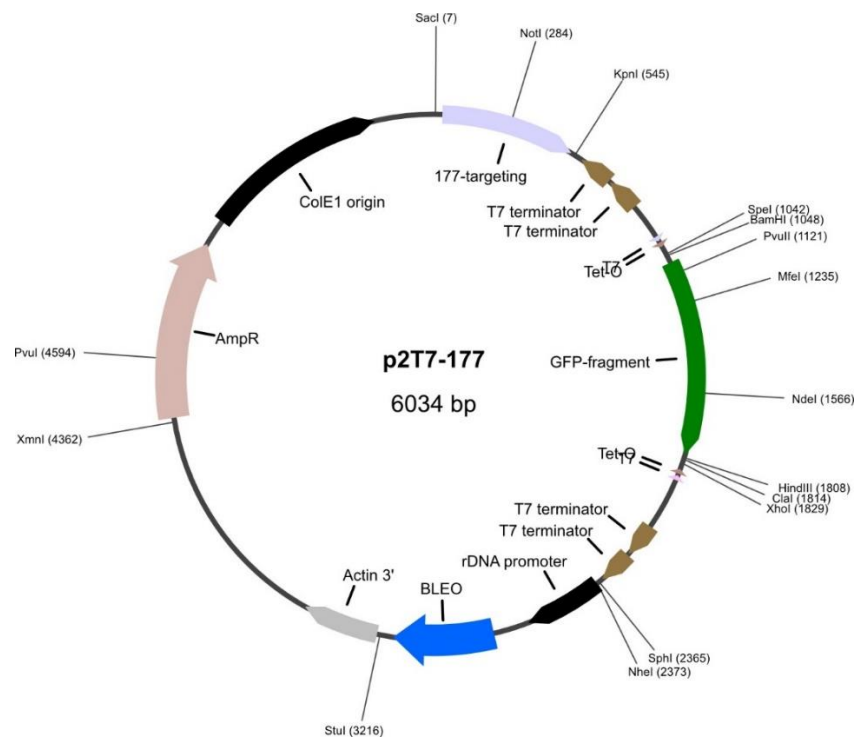
Citomix: KCl 120 mM; CaCl₂ 0,15 mM; K₂HPO₄ 10 mM; HEPES 25 mM pH: 7.6; EDTA 2mM, MgCl₂ 5mM.

Amaza buffer: 50 mM HEPES; 5 mM KCl; 0.15 mM CaCl₂; 90 mM Na₃PO₄. Ajustar a pH 7.3 y filtrar.

4- Vectores

- **pGEM®-T Easy de Promega.**
- ***Trypanosoma cruzi*:**
 - **pRIBOTEX** (Martínez-Calvillo, Ló Pez, et al., 1997)
 - **pTREX** (M. P. Vazquez & Levin, 1999)
- ***Trypanosoma brucei*:**
 - **p2T7-177**(Wickstead et al., 2002)
 - **pLEW100V5-BSD:** construido por el laboratorio de George Cross (Addgene plasmid #27658; <http://n2t.net/addgene:27658>; RRID: Addgene_27658)





5- Oligonucleótidos

Identificación	Sentido 5'→3'
TcVps32-Fw-pRibo-BamHI	GGATCCATGTTGAGTCGTCTCTTTGGTAG
HA-TcVps32-Fw-pRibo-BamHI	GGATCCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTTGAGTCGTCTCTTTGGTAG
TcVps32-Rev-pRibo	AAGCTTCTA AGACTGAAGTTCTGCCTCA
Δ6-TcVps32-Rev-HindIII	AAGCTTCTATTCTTTGGCACTCAACTTCGG
Δ6L-TcVps32-Rev-HindIII	AAGCTTCTACTGCAGTTCCGCCATGAGTTCT
Δ6y5L-TcVps32-Rev-HindIII	AAGCTTCTAGTCGAGCGGCTGTCGCAG
TcVps32-Fw-pTREX-XbaI	TCTAGAATGTTGAGTCGTCTCTTTGGTAG
TcVps32-Rv-pTREX-HindIII	AAGCTTCTAAGACTGAAGTTCTGCCTCA
HA-TbVps32-Fw-NheI 5'	GCTAGCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTTTGGCCGGTTATTTGGTTTAAAG
TbVps32- Rev- BamHI	GGATCCTCACGACAGTAGTTCCTCTCT
TbVps32-RNAi-Fw-BamHI	GGATCCAGCTTGCAAAGGCAAGAGAG
TbVps32-RNAi-Rv-HindIII	AAGCTTCTCCTCTCTTCGTCCACAG
Tb_SL_1-27	AACTAACGCTATTATTAGAACAGTTTC
Rv-TbAct-142	TTCCCATCATCGCTTGCTCATT
Rv-TbVps32-143	TTCTTCGTCAAGACGCCCTCA

6- Anticuerpos

Descripción	Proveedor	IFI	WB
Rat anti-HA high affinity monoclonal	Sigma Aldrich	1/200 1/400	1/2000
Anti-Rat IgG conjugado con HRP	Sigma Aldrich		1/4000
Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG	Sigma-Aldrich	1/400	-
Alexa Fluor 546 goat anti-rat IgG	Sigma-Aldrich	1/400	-
Rabbit anti-TbCatL	Gentileza de Dr. James Bangs, Universidad de Búfalo	1/2000	-
Alexa Fluor 594 goat polyclonal anti-Rabbit IgG	Invitrogen	1/500	-
Alexa Fluor 488 goat polyclonal anti-Rabbit IgG	Invitrogen	1/500	-
Mouse monoclonal anti-α-Tubulin	Sigma-Aldrich	1/1000	-
Alexa Fluor 488 goat polyclonal anti-Mouse IgG	Invitrogen	1/600	-
Suero de ratón chagásico crónico	Gentileza de Dra. Karina Gómez	1/1000	-
Alexa Fluor 594 goat polyclonal anti-Mouse IgG	Invitrogen	1/500	-

Rabbit Anti-EEA1 polyclonal	Calbiotech (CAT 3246610)	1/100	-

7- Métodos

7.1 Técnicas de DNA

Extracción de DNA genómico

Un cultivo con un número total de $1-2 \times 10^8$ epimastigotes fue centrifugado a 1500 xg por 5 min, descartándose el sobrenadante. El precipitado de parásitos fue resuspendido en 1 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 0,01 M pH 7, 50; EDTA 0,1 M; SDS 1% (m/v)) y luego se realizaron dos extracciones con 0,5 mL de fenol: cloroformo:alcohol isoamílico en relación 25:24:1 (PIC), cada vez mezclando y separando las fases por centrifugación a 13000 rpm por 2 min. Luego de la última extracción, la fase acuosa se traspasó a un nuevo tubo y se incubó durante 2 horas a 37°C con RNasa (50 µg/mL). Se realizó una nueva extracción con PIC y otra con fenol: cloroformo (24:1). A la fase acuosa obtenida de esta última extracción se le agregó un volumen de 2-propanol y se centrifugó por 20 min a 13200 rpm. Se descartó el sobrenadante, y al precipitado de ADN se le hizo dos lavados con 1 mL de etanol al 70%. Luego de dejar secar el precipitado se lo resuspendió en 100-200 µL de agua libre de nucleasas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de secuencias identificadas se diseñaron los oligonucleótidos o primer que se usaron en las diferentes reacciones de amplificación por PCR. La mezcla de amplificación estuvo siempre compuesta por el ADN molde correspondiente, 100 ng de cada oligonucleótido, 1-2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, buffer Taq 1x y 2,5-5 U/50µl de enzima ADN polimerasa. Cuando el templado fue ADN plasmídico la masa utilizada por reacción fue de 10 ng, mientras que cuando el templado fue ADN genómico la masa de este por reacción fue de 200-500 ng. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 25-50 µl.

El procedimiento general de las reacciones involucra los siguientes pasos:

1. Desnaturalización inicial del ADN por calentamiento a 95°C durante 5 min.
2. Ciclado (por lo general se utilizaron 35 ciclos) y comprende 3 pasos:
 - a. Desnaturalización a 95°C durante 1 min.
 - b. “Annealing”: se ajusta a los oligonucleótidos utilizados
 - c. Elongación a 72°C: se ajusta a la longitud de fragmento a amplificar.
3. Extensión final, a 72°C durante 10 min. para terminar de extender las cadenas incompletas.

A continuación, se detallan las condiciones especiales requeridas para amplificar las secuencias genómicas de interés:

Secuencia genómica	Enzima utilizada	Condición específica de amplificación	Descripción
TcVps32 (pRIBOTEX) HA-TcVps32 (pRIBOTEX) Vps32 (pTREX)	EasyTaq® DNA Polymerase (Transgene biotech)	• <i>Annealing</i> 30 seg 55°C • Elongación 58°C • 35 ciclos	Sobreexpresión de HA-TcVps32 de <i>T. cruzi</i>
cDNA TbVps32RNAi	EasyTaq® DNA Polymerase EasyTaq® DNA Polymerase	• <i>Annealing</i> 30 seg 55°C • Elongación 72°C • 30 ciclos	RT-PCR para evaluar el silenciamiento génico de TbVps32 de <i>T. brucei</i> mediante RNAi
Actina control	EasyTaq® DNA Polymerase (Transgene biotech)	• <i>Annealing</i> 30 seg 52 °C • Elongación 72 °C • 30 ciclos	Control de carga de RT-PCR
HA-Δ6TcVps32	One Taq Hot Start (NEB)	• <i>Annealing</i> 30 seg a 58°C • Elongación 1 min a 72°C • 35 ciclos	Sobreexpresión de constructo delecionado de HA- TcVps32 de <i>T. cruzi</i>
HA-Δ6LTcVps32	EasyTaq® DNA Polymerase (Transgene biotech)	• <i>Annealing</i> 30 seg a 57°C • Elongación 1 min a 72°C • 35 ciclos	Sobreexpresión de constructo delecionado de HA-TcVps32 de <i>T. cruzi</i>
HA-Δ6y5LTcVps32	EasyTaq® DNA Polymerase (Transgene biotech)	• <i>Annealing</i> 30 seg a 57°C • Elongación 1 min a 72°C • 35 ciclos	Sobreexpresión de constructo delecionado de HA-TcVps32 de <i>T. cruzi</i>
HA-TbVps32 (pLew100v5-BSD)	Taq DNA Polymerase (NEB M0267s)	• <i>Annealing</i> 30 seg a 58°C • Elongación 1 min a 72°C • 35 ciclos	Sobreexpresión inducida de HA-TbVps32 de <i>T. brucei</i> PCF y BSF.

Subclonado de fragmentos de PCR

Todos los fragmentos de PCR fueron subclonados en pGEM®-T Easy. El subclonado se realizó

según el protocolo provisto por cada fabricante. Este plásmido presenta bases T que sobresalen en los extremos 3', permitiendo así la ligación en forma muy eficiente de fragmentos de PCR que presentan bases deoxiadenuina en sus extremos 5' adicionadas por la Taq polimerasa. Todos los genes amplificados e insertados en estos vectores fueron enviados a secuenciar para confirmar la fidelidad de la amplificación. Una vez obtenidas las secuencias, se eligió un clon para proseguir con el clonado en los vectores destinos finales.

Reacciones de ligación

Se utilizaron entre 50 y 100 ng de vector y se practicaron diferentes relaciones molares de inserto:vector (1:1, 3:1 y 5:1) manteniendo constante la masa de vector y variando la cantidad de inserto.

La masa del inserto fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{masa del vector} \times \text{tamaño del inserto} \times \text{relación inserto-vector}}{\text{tamaño del vector}} = \text{masa del inserto}$$

Los volúmenes de reacción fueron de 10 o 20 µl utilizando la enzima ADN ligasa del fago T4 (*New England Biolabs*). Para ligar se utilizó 0,5 -1 U de enzima y se incubó la mezcla a 25 °C a 15 min.

Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción.

La cantidad de DNA a digerir es 1 µg con enzimas de restricción de la marca *New England Biolabs*. El volumen de enzima corresponde a utilizar corresponde 10 U de la enzima. En la mezcla de reacción se incluyó el buffer compatible con la enzima, el cual se lleva a una concentración 1X (concentración original del buffer 10X). Cuando se realiza el chequeo de la integridad del plásmido, el volumen final a utilizar es de 10 µL y cuando se realiza una preparación del vector, el volumen final es de 30 µL. Las reacciones luego se incuban durante 2-3 horas a 37 °C. En caso de variar la masa de ADN a digerir, tanto las unidades de enzima como el volumen de reacción fueron modificados en forma proporcional.

Preparación de los plásmidos:

Minipreparación de DNA plasmídico a partir de bacterias

Una colonia bacteriana aislada de placa LB-Agar fue crecida toda la noche a 37°C en 3 mL o 5 mL de medio líquido fresco (suplementado con el antibiótico correspondiente). Al día siguiente el cultivo se centrifugó por 10 min a 4000 rpm a temperatura ambiente y el

sobrenadante fue descartado. El precipitado bacteriano fue resuspendido exhaustivamente en 200 µL de solución 1, luego se agregó 300 µL de solución 2 (preparada en el momento) para la lisis celular y se procedió a agitar suavemente por inversión. Luego se incubó por 5 min en hielo y se agregó 300 µL de solución 3, mezclándose vigorosamente por inversión del tubo Eppendorf. Se dejó reposar 5 min en hielo y luego se centrifugó por 10 min a 14000 rpm. El sobrenadante fue traspasado a un nuevo tubo Eppendorf y se agregó RNAsa (50 µg/mL), incubándose por 60 min a 37°C. Pasado dicho tiempo, se realizaron dos extracciones consecutivas con 400 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), cada vez mezclando y separando las fases por centrifugación. Posteriormente el ADN plasmídico se precipitó con el agregado de un volumen de 2-propanol. Luego se centrifugó por 30 min a 13000 rpm. El precipitado fue lavado dos veces con etanol al 70% y resuspendido en 50 µL de agua hexadestilada.

Preparación de plásmidos para transfectar parásitos

Cuando la cantidad de DNA plasmídico obtenido mediante las minipreparaciones fue suficiente, se utilizó este material para transfectar parásitos. En los casos en los que no hubo recuperación suficiente, los plásmidos se purificaron a partir de 250 mL de cultivo de bacterias cepa DH5α del clon confirmado como positivo, crecidas en medio LB en presencia de 50 µg/mL de ampicilina. Luego, se procedió a la utilización de columnas de intercambio aniónico QIAGEN–tip 500 (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Se solubiliza la agarosa (Invitrogen) en buffer TAE 1X y se agrega bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/mL. Las muestras son mezcladas con el volumen correspondiente al Buffer de siembra para DNA 6X. Luego se procede a la siembra en el gel. La corrida se realiza a una intensidad de 5-10 V/cm, siendo el buffer de corrida TAE 1X. Finalmente, los geles fueron observados en un transiluminador UVP y fotografiados.

Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de restricción o productos de PCR a purificar fueron separados por electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1X. Las bandas correspondientes al fragmento de DNA a purificar se cortaron del gel visualizándolas en un transiluminador de luz UV. Se utilizó el kit de purificación PCR *Clean-up system* (Promega) siguiendo las indicaciones del

fabricante.

Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR fue realizada a través del servicio de secuenciación de la empresa MacroGen Inc. Los resultados provistos por esta compañía fueron analizados mediante los programas Vector NTI 10.

7.2 Técnicas de RNA

Extracción de RNA total mediante Trizol

Previamente al ensayo y teniendo en cuenta las curvas de crecimiento, se preparan cultivos de parásitos en botellas de 75 cm² con el objetivo de obtener un cultivo de $5 \cdot 10^6$ parásitos/mL. Estos cultivos son traspasados a tubos falcon de 50 mL y se procede a la centrifugación por 10 min a 2000 rpm a temperatura ambiente. Luego, el pellet con los parásitos es resuspendido en 1 mL de Trizol y el volumen se trasvasa a tubos eppendorfs de 1,5 mL. Si no se va a continuar con la extracción, este material puede ser congelado a -80°C. Si se continua con la extracción de RNA, se agrega 200 µL de Cloroformo (también puede ser isoamílico), se mezcla por vórtex 30 seg y se deja en hielo 5 min. Pasado este tiempo, los tubos son centrifugados a 12000 xg durante 15 min a 4°C. Al sobrenadante obtenido (500-600 µL) se le agrega un volumen de isopropanol 100%, se mezcla por inversión y se deja precipitar durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, los tubos nuevamente son centrifugados a 12000 xg durante 30 min a 4°C y el sobrenadante es descartado. El pellet se lava con 1,5 mL de Etanol 75%. Luego, se centrifuga nuevamente a 12000 xg durante 10 min a 4°C, descartándose el sobrenadante. Se deja secar a temperatura ambiente y una vez realizado esto, se resuspende en 50-100 µL en H₂O DEPC.

RT-PCR

Se utilizó el kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* de Invitrogen. Para cada reacción de PCR reversa se mezclaron el ARN extraído (hasta 5 µg), 50 µM de cebador Oligo dT, 50 ng/µl de cebador degenerado (Random hexamer), y 10 mM de dNTPs, en un volumen final de hasta 10 µl. Para cada tubo de RNA ensayado se agrega también un tubo control al que no se le agregará la enzima Transcriptasa Reversa. Los tubos son incubados a 65°C durante 5 min para desnaturalizar el RNA. Luego, se prepara la Mix de síntesis de cDNA para cada tubo

de la siguiente manera: Tris-HCl pH 8 10 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 10 mM, RNaseOut 2 U/μl y SuperScript III RT 10 U/μl. Se mezclan la solución de RNA con la solución Mix, se mezcla suavemente, se centrifuga brevemente. La mezcla se somete al siguiente ciclo: 10 min a 25°C (hibridación de cebadores) 50 min a 50°C (amplificación de cDNA) y 5 min a 85°C (inactivación de la RT, frenado de la reacción). Al finalizar la reacción, los tubos son transferidos al hielo. Luego se agregaron 0,5 U/μl de RNasaH a cada tubo y se incubaron por 20 min a 37°C para degradar el RNA. Los tubos se preservan a -20°C hasta el momento de uso.

Electroforesis de ARN en gel de agarosa

El gel se prepara solubilizando 1,5 g de agarosa (Invitrogen) en una solución de MOPS 1X y formaldehído 1,6% (v/v). La muestra de RNA se mezcla con el volumen correspondiente de buffer de siembra para ARN 2X. La corrida se realizó a una intensidad de 5-10 V/cm en buffer MOPS 1X con formaldehído 1,6% (v/v). Los geles fueron observados en un transiluminador UVP y fotografiados.

7.3 Técnicas con bacterias

Transformación de bacterias

Una alícuota de 50 μL de bacterias *E. coli* competentes se descongela en hielo. Luego se agrega ADN plasmídico para transformar (la masa se ajustó dependiendo de la cepa bacteriana) y se incuba en hielo durante 20 min. Luego, las bacterias se exponen a 42°C durante 60 segundos y se dejan recuperar durante 5 min en hielo. Pasado este tiempo, se agrega 800 μL de LB fresco y el tubo se incuba durante 40 min a 37°C. Luego, la suspensión bacteriana se centrifuga durante 5 min a 5000 rpm y el sobrenadante se descarta, dejando un remanente de 100 μL. El pellet bacteriano se resuspende en este volumen y las bacterias son sembradas en placas de LB suplementado con el antibiótico correspondiente como marcador de selección (Ampicilina 50 μg/mL).

7.4 Técnicas de proteínas

Preparación de extractos proteicos de parásitos

Los parásitos se cosecharon a 2500 xg 10 min, se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en Buffer de lisis para extracto de proteínas de parásitos. La ruptura de las células se llevó a cabo por 7 ciclos de congelado/descongelado en N₂ líquido/agua:hielo. Luego la muestra se

centrifugó a 2000 xg a 4°C, se descartaron los restos celulares y se obtuvo el extracto crudo.

Alternativamente, se procedió a utilizar el siguiente protocolo: se tomó un volumen de parásitos de aproximadamente 10^7 parásitos/mL y se procedió a la centrifugación a 4°C durante 10 min a 800 RFC. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con PBS 1X. Luego, se agregaron 200 µL de Buffer hipotónico y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, se sonicó a 25 KHz 30 min.

Se tomó 24 µL, se colocó 6 µL de CB5X y se procedió a calentar a 99 °C durante 7 min o 10 min. Los extractos fueron guardados a -80 °C.

Determinación de la concentración proteica mediante el método de Bradford

(Bradford, 1976).

A 10 mL de cada muestra se le agregó 190 mL de reactivo de Bradford y se hicieron las lecturas de absorbancia a 620 nm en placas de poliestireno de 96 pocillos. Cada muestra se mide por duplicado. Se utiliza una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) para la determinación de la concentración proteica de las muestras por interpolación.

Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Entre 50-80 µg de proteínas totales para extractos de parásitos se mezclan con Buffer de siembra para proteínas 5x, hervidos 5 min y sembrados en geles de poliacrilamida (10-12%) desnaturalizantes. La corrida electroforética se realizó en buffer Tris-glicina con SDS al 0,1% a una corriente eléctrica constante de 35 mA por gel.

Western blot

Las muestras resueltas en SDS-PAGE son luego transferidas a membrana de nitrocelulosa o PVDF. Estas son además teñidas con Rojo Ponceau para evaluar la calidad de la transferencia. Posteriormente, las membranas se bloquean con una solución de bloqueo (3% p/v de leche descremada en buffer TBS 1X, Tween-20 0,1% v/v -TBS-T-) durante 1-2 horas a temperatura ambiente en agitación o durante toda la noche a 4°C. Completado este proceso de bloqueo, la solución se descarta y se procede a la incubación de las membranas con la dilución del anticuerpo primario por 1-2 horas a temperatura ambiente (en algunos casos toda la noche a 4 °C). Al retirar la solución del anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T para luego agregar la solución del anticuerpo secundario conjugado (diluciones en solución de bloqueo). La incubación con este anticuerpo es de 1-2 horas a temperatura

ambiente, y luego se procede a lavar la membrana 3 veces de 5 min con TBS-T. El revelado se realiza incubando las membranas con la solución de ECL (*Perkin Elmer*).

7.5 Técnicas con parásitos

Transfección de *T. cruzi*

Día 1

10⁸ parásitos totales, crecidos en 10 mL LIT a 28 °C, son centrifugados a 3500 rpm durante 5 min. El pellet se lava con PBS 1X y luego es resuspendido en 350 µL de buffer de electroporación (PBS, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 0,1 mM). La suspensión celular resultante se mezcla con 50 µg de plásmido DNA purificado usando el procedimiento de Qiagen en cubetas de 0,2 cm. Luego se procede a la electroporación de los parásitos mediante el electroporador BioRad (Laboratories, Hércules, CA, USA) con una simple descarga de 400V, 500 µF con constante de tiempo de alrededor de 5 ms. Luego de este procedimiento, los parásitos son incubados durante 24 horas a 28°C en medio LIT.

Día 2

Al día siguiente de la transfección se procede a tomar 1 mL de cultivo de la botella y se coloca en el pocillo de la primera fila de una placa de 24 pocillos. Esto se repite hasta completar el llenado de los 6 pocillos de la placa de la fila 1. Luego se agregan concentraciones crecientes de G418 (antibiótico de selección) desde el pocillo 1 de la fila, al pocillo 6. A los 4 mL restantes de la botella se le agrega G418 100 µg/mL y, de esta manera, se continúa la selección en botella paralelamente durante 4 semanas.

Luego de la primera semana de traspaso del medio de la botella a la placa, se toma el volumen de cada uno de los pocillos por separado y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min. Luego el pellet resultante de cada pocillo se resuspende en 1 mL de medio LIT fresco y en el que se haya adicionado la concentración específica de G418. Inmediatamente, cada cultivo se dispone en un pocillo de la segunda fila de la placa, siempre respetando el orden de la primera placa utilizada, y, por lo tanto, respetando la concentración utilizada del antibiótico de selección. Este procedimiento se repite en las semanas 3 y 4 y se encuentra esquematizado en la **FIGURA 1**.

Luego de la cuarta semana, se procede al pasaje de los cultivos que representan la

concentración de antibiótico 62,5 µg/mL y 125 µg/mL a la botella.

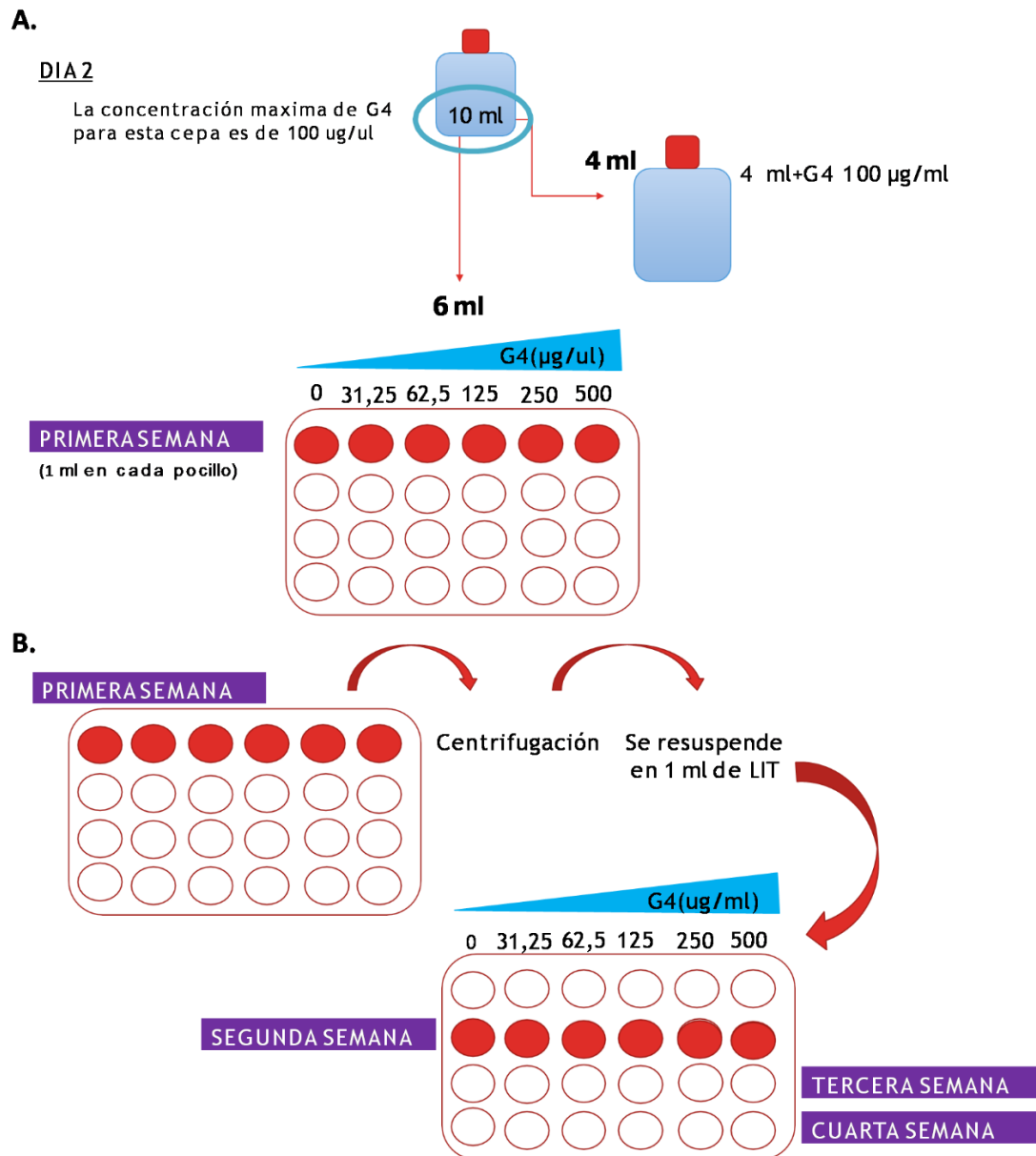


FIGURA 1. Proceso de selección clonal en *T. cruzi*. **A.** Los cultivos transfectados son transferidos desde la botella a la primera fila de la placa de 24 pocillos. Lo mismo se realiza para los controles negativos. En ambas placas, las células de cada pocillo son incubadas con concentraciones específicas del antibiótico de selección. **B.** Luego de culminada cada semana de selección, las células de cada pocillo son centrifugadas y resuspendidas en medio fresco suplementado con la concentración específica del antibiótico de selección.

Transfección de *T. brucei* estadio procíclico (PCF)

Día 1. Transfección

Partiendo de un cultivo de concentración inicial $5 \cdot 10^6$ parásitos/mL, se toman

aproximadamente 10^9 células totales y son cosechadas por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Luego, el pellet es lavado con 10 mL de buffer Citomix Frío. Inmediatamente, el pellet es resuspendido en 500 μ L del mismo buffer conteniendo, además, 10 μ g de DNA linealizado con NotI (esterilizada 15 min a 65°C). Esta suspensión se coloca dentro de las cubetas de 2 mm, mantenidas en hielo desde el inicio de la transfección. La electroporación se lleva a cabo con el equipo *Gene Pulser* (Bio-Rad) a un voltaje de 1,5kV, 25 microfaradios de capacitancia y 2 pulsos. Luego los cultivos transfectados son resuspendidos en 10 mL de SDM-79 suplementado con 10% de SFB, 15 μ g/mL G418, 50 μ g/mL Hlgromicina.

Día 2.

Al día siguiente de la transfección se le agrega el antibiótico de selección (20 μ g/mL de zeocina para las líneas RNAiTbVps32, 5 μ g/mL blasticidina para HA-TbVps32pLew100v5BSD PCF y 10 μ g/mL de blasticidina para HA-TbVps32pLew100v5BSD BSF) a 10mL de las botellas (control y parásitos transgénicos) (**FIGURA 2**). Luego, a partir de cada botella se procede a tomar 1 mL y se coloca en la primera fila de una placa de 24 pocillos. En las tres filas restantes, se coloca 500 μ L de medio SDM-79 fresco en cada pocillo. Posteriormente, se proceden a realizar diluciones seriadas desde la fila 1 a la fila 4, tomando 500 μ L del pocillo de la primera fila y luego descargando este volumen en el pocillo de la siguiente fila. Esto se realiza sucesivamente hasta la fila 4, quedando un volumen final de 1 mL en estos pocillos. El mantenimiento de los cultivos en placa la realizamos quitando medio agotado y agregando medio nuevo teniendo en controlando la densidad de los cultivos. Cuando la densidad de los mismos llega a un punto de saturación, se procede a preparar otra placa de 24 pocillos con 200 μ L del pocillo y 800 μ L de SDM-79 fresco con antibiótico. Se respeta el orden de los pocillos de la primera placa para proseguir con la selección en la siguiente. Finalmente, luego de dos semanas de selección en placa, se procede al pasaje de los cultivos a la botella. De esta manera, a 2,5 mL de medio SDM-79 fresco con zeocina, se le adiciona 500 μ L de cultivo del primer pocillo de la fila 1 de la placa. Se realiza el mismo procedimiento con los siguientes pocillos de la primera fila. Cada botella es mantenida realizando diluciones de los cultivos cada 4 días.

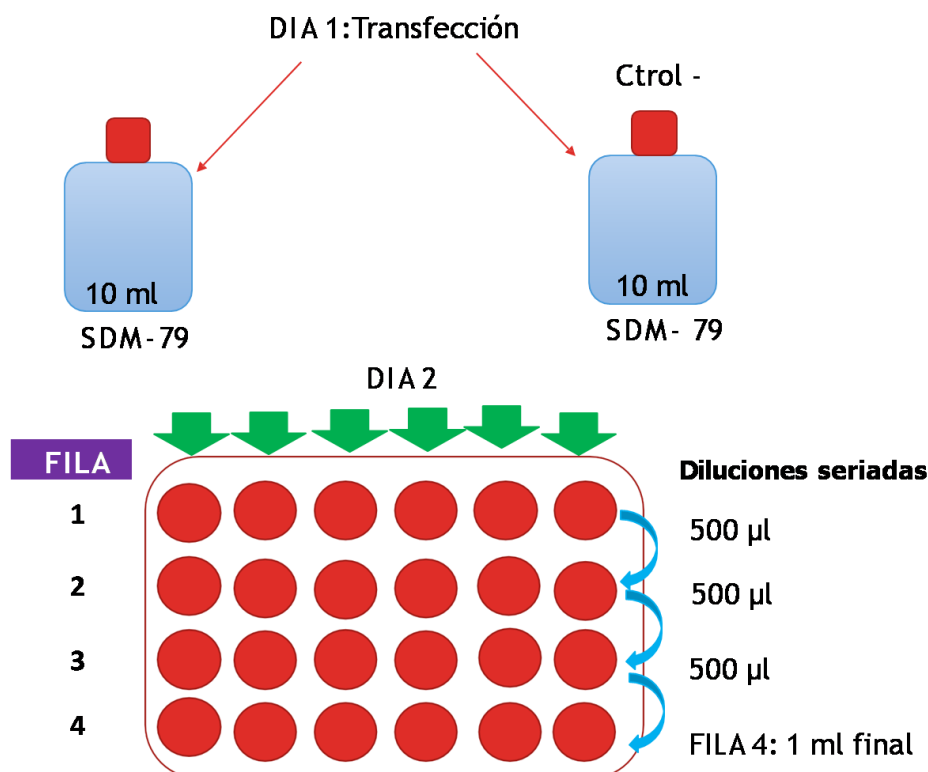


FIGURA 2. Proceso de selección clonal en *T. brucei* PCF y BSF. Para el caso de *T. brucei* BSF, se parte de un volumen de cultivo diferente desde el día 1, pero se mantiene la selección por dilución seriada en placa.

Transfección de *Trypanosoma brucei* estadio sanguíneo (BSF)

Dividir el cultivo celular en dos tubos Falcon (alrededor de 20–25 mL por tubo) y centrifugar a 3500 rpm durante 3 min. Luego, lavar el pellet celular con 1 mL de Buffer TDB. El pellet es resuspendido en 100 µL de Buffer de transfección Amaxa. A uno de los tubos se le debe añadir 10 µg del ADN linealizado y al otro el volumen correspondiente de agua ultrapura estéril (control negativo). Mezclar bien para asegurar una suspensión homogénea. Inmediatamente, se transfiere la suspensión celular a una cubeta y se realiza la transfección utilizando el programa Z-001 del equipo Nucleofector. Luego de la electroporación, incubar las células en 25 mL de medio HMI-9 previamente calentado y equilibrado (en condiciones de cultivo), durante 4 a 6 horas para favorecer la recuperación. Para llevar a cabo la selección, se preparan diluciones seriadas de las células en placa de 24 pocillos. De esta manera, se añaden 2 mL de las células en HMI-9 con antibiótico a cada pocillo de la primera fila de la placa. En las filas restantes se agrega el medio fresco con el antibiótico. Luego se procede al traspaso de 500 µL desde la fila 1 a la fila 2 y desde ésta a la fila 3. Se repite hasta la fila 4. Finalmente se mantienen

las placas en condiciones estándar de cultivo por aproximadamente 5 a 7 días. Las células sobrevivientes deben considerarse como transfectantes exitosa una vez que las del control negativo hayan muerto.

Curvas de crecimiento de *T. brucei* PCF

Las densidades celulares se mantuvieron en 10^6 células/mL durante 2 días antes de la construcción de las curvas de crecimiento, realizando los recuentos con cámara de Neubauer. Al momento de la construcción de la curva, la densidad celular se ajustó a 5×10^5 células/mL, siendo este el punto de inicio de las curvas de crecimiento de los cultivos control y tratados con Tetraciclina. Luego, ambos cultivos fueron contabilizados día por día durante 7 días. En el caso de los cultivos tratados, el agregado de Tetraciclina ($1 \mu\text{g/mL}$) se realizó desde el inicio de la curva y hasta el día 7. En los cultivos de *T. brucei* procíclico, a las 72 horas se procede a la dilución de los cultivos a 5×10^5 células/mL.

Curvas de crecimiento de *T. brucei* BSF

Los cultivos fueron contabilizados en cámara de Neubauer e iniciados a una densidad de 1×10^8 parásitos/mL. En el caso de los cultivos tratados, el agregado de Tetraciclina ($1 \mu\text{g/mL}$) se realizó desde el inicio de la curva.

Microscopía de Fluorescencia: tinción con DAPI

Se toma 1-2 mL de cultivo y se centrifuga a 3000 rpm a 10 min a temperatura ambiente. El pellet se lava con 1 mL de PBS 1X y, posterior centrifugación, se procede a la fijación con Paraformaldehído 4% durante 1 hora a 4 °C. Pasado este tiempo, se centrifuga, se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en 500 μL o 1 mL de PBS. Estas muestras pueden ser guardadas a 4°C no más de una semana. Paralelamente, marcar los portaobjetos con lápiz hidrofóbico y tratarlos con 10 μL poli-L-lisina 0,1% p/v y dejar 30 min a temperatura ambiente. Luego, lavarlos con PBS 1X filtrado. Adherir las células resuspendidas en PBS a los portaobjetos (aproximadamente adherir 10000 parásitos por pocillo). Incubar 30 min a temperatura ambiente y luego lavar con PBS 1X. Proceder al montaje con *Vectashield Mounting Medium*+ DAPI (1:2000). y colocar el cubreobjetos. Observar al microscopio o dejar a 4 °C protegido de la luz.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Se centrifugan aproximadamente 3-5 mL de epimastigotes de una densidad de

2-5.10⁷ parásitos/mL a 3000 rpm 10 min. Luego, el pellet se lava dos veces con PBS 1X pH 8. En el caso de *T. brucei*, se toman 3 mL e idealmente tomar células fase exponencial de crecimiento. Luego del lavado, los parásitos se fijan durante 15 min con paraformaldehído 4% V/V a 4°C. Posteriormente a esto, se realiza un lavado con PBS 1X. Paralelamente, se marcan los contornos de los cubreobjetos con marcador hidrofóbico y se tratan una solución de poli-L-lisina 0,1% p/v. Las células se colocan en cubreobjetos y se dejan adherir por 10 min. Los portaobjetos con los parásitos adheridos se permeabilizan con 60-30 µL Tritón X-100 0,2% en PBS durante 10 min. Luego, se retira el Tritón, se agrega NH₄Cl 50 mM y se incuba durante 30 min. Pasado este tiempo, se retira el NH₄Cl y se realizan dos incubaciones con PBS-BSA 3% por 15 min cada una. Luego de este procedimiento, se incuban con los anticuerpos primarios correspondientes preparados en PBS-BSA 3% durante 1 hora. Se prosigue a realizar tres lavados con PBS-Tween 0,05% de 10 min cada uno y se incuba con los anticuerpos secundarios correspondientes preparados en PBS-BSA 3% durante 1 hora en oscuridad. Se realizan tres lavados con PBS-Tween 0,05% de 10 min cada uno y luego dos lavados más con PBS de 10 min cada uno. Finalmente se colocan los cubreobjetos sobre los portaobjetos y se agrega 10µL *Vectashield Mounting Medium*+ DAPI (1:2000).

Sincronización con Hidroxiurea

La sincronización de las formas procíclicas de *T. brucei* en fase S mediante hidroxiurea (HU) se realizó según se ha descrito (Redmond et al., 2003). Se incuba un cultivo de 10 mL (2,5.10⁶ células/mL) conteniendo 0,2 mM de hidroxiurea (HU) durante 12 horas. Al cabo de ese periodo de tiempo, la misma es eliminada por centrifugación del cultivo a 1200 xg por 10 min. Luego se procede al lavado de las células dos veces con medio de cultivo fresco a temperatura ambiente. Tras la eliminación de la HU y para evaluar la sincronización, se tomaron muestras a distintos tiempos, luego de reiniciado el ciclo celular, y se fijaron y tiñeron con yoduro de propidio (PI) para el análisis posterior por citometría de flujo.

Citometría de flujo

Se recolecta 10⁶ células por muestra y se centrifugan a 600 xg durante 10 min. Luego, se realiza dos lavados con PBS frío suplementado con 2 mM de EDTA. Los pellets celulares se resuspenden en 200 µL de PBS 1X con 2 mM de EDTA y se fijan añadiendo 1,5 mL de etanol 70% en PBS, en forma de goteo. Las muestras se almacenan a 4 °C durante la noche.

Las células fijadas se lavan con PBS y luego se resuspenden en 1 mL de PBS que contiene 10 µg/mL DNase-free RNase A y 20 µg/mL ioduro de propidio (PI). La mezcla se incuba a 37 °C durante 30 min y luego se analiza en un citómetro de flujo FACS MELODY (BD Biosciences). Los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular se evaluaron mediante el software FlowJo. Para el análisis de los resultados primero se creó un dot plot de FSC-A vs SSC-A (gate 1) para descartar los restos celulares. Luego, con la población de interés del primer gate, se realizó un segundo dot plot de PI-W vs PI-A (gate 2) para descartar a los agregados celulares. A partir de la población seleccionada del segundo gate se construyó el histograma de PI-A para analizar el ciclo celular.

Ensayos de endocitosis

Previo al ensayo, los cultivos son tratados con Tetraciclina a 1 µg/mL. Las células se recolectan y se lavan una vez en medio SDM-79 sin suero, suplementado con 1% de BSA. Posteriormente, se incuban en SDM-79/BSA sin suero a 28°C durante 30 min. Para el seguimiento de la endocitosis, se añaden individualmente Alexa Flúor 546 Dextrano 10000 MW (*Molecular Probes*, Oregon, USA) (5 mg/mL), Transferrina marcada con FITC (*Molecular Probes*, Oregon, USA) (100 µg/mL) y DQ-BSA (*Molecular Probes*, Oregon, USA) (10 µg/mL), e inmediatamente las células se incuban durante otros 30 min a diferentes temperaturas. La captación del trazador se detiene mediante la adición de 1 mL de medio SDM-79 frío y un lavado 4°C antes de ser fijadas durante 30 min a 4°C en formaldehído 4%. Posteriormente las células son adheridas a portaobjetos tal como en las Inmunofluorescencias. Las imágenes se tomaron en condiciones no saturantes utilizando tiempos de exposición idénticos. La cuantificación se realizó por citometría de flujo en un equipo FACS MELODY (BD *Biosciences*). Los valores se presentan como la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los parásitos inducidos o no inducidos, menos la MFI correspondiente a los parásitos sin marcador.

8-Análisis in silico

Bases de datos	
TriTrypdb	https://tritrypdb.org/tritrypdb/app
PDB database	https://www.rcsb.org/
TrypTag	http://tryptag.org/
Programas	
BLASTP	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
CABSflex	http://212.87.3.12/CABSflex2/submit

ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)
Compute pI/Mw ExPASy	https://web.expasy.org/compute_pi/
Protein Isoelectric Point (SMS)	https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_iep.html
DrawCoil 1.0	https://grigoryanlab.org/drawcoil/
GPS 2.1 (Xue et al., 2008)	https://gps.biocuckoo.cn/download.php
InterProScan	http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/
Jpred	https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/
PrDOS	http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi
Protein Isoelectric Point SMS	https://groups.molbiosci.northwestern.edu/matouschek/links/sms2/protein_iep.html
RaptorX	http://raptorx.uchicago.edu
Swiss Model	https://swissmodel.expasy.org/
TrypanoFAN	http://trypanofan.bioc.cam.ac.uk/trypanofan/main/
UCSF Chimera	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/related/related.html
VectorNTI8	http://es-ar.invitrogen.com/site/mx/es/home/Products-and-Services/Webcutter 2.0
Webcutter 2.0	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/
ImageJ	https://imagej.net/ij/download.html
FlowJo	https://www.flowjo.com/

Resultados

BÚSQUEDA Y DETECCION DE GENES Vps32 en *T. cruzi* y *T. brucei*.

1. TcVps32 de *Trypanosoma cruzi*.

Identificación de los genes TcVps32 en *Trypanosoma cruzi*

Los tripanosomátidos son organismos eucariotas ancestrales cuyas características biológicas han sido útiles en la adaptación al parasitismo. Han sabido modificar vías de señalización alejándose de las rutas canónicas, por lo que decidimos realizar una búsqueda “no sesgada” que contemple la mayor cantidad de características presentes en las secuencias proteicas Vps32 de otros organismos. Previamente, se ha reportado una significativa conservación de los componentes de los complejos ESCRT en organismos eucariotas, especialmente del complejo ESCRT-III. La proteína Vps32, miembro de este subcomplejo, ha sido ampliamente caracterizada en *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*, motivo por el cual han sido consideradas modelo de estudio. Para la búsqueda de secuencias candidatas para TcVps32 en *Trypanosoma cruzi*, utilizamos la secuencia Vps32 de *S. cerevisiae*, conocida como Snf7, debido a la estrecha distancia evolutiva observada entre los genes Vps32 de este organismo con organismos tripanosomátidos y debido a que, mientras que en *H. sapiens* se evidencian tres isoformas de Vps32 (conocidas como CHMP4a, CHMP4b y CHMP4c), en *S. cerevisiae* sólo existe una isoforma de Vps32 (Leung et al., 2008).

La secuencia proteica Vps32 (ESCRT-III subunit protein SNF7) de *S. cerevisiae* (Rothman et al., 1989) fue utilizada como secuencia de referencia para la búsqueda de genes homólogos en la base de datos BLASTP del NCBI. Este análisis resultó en un listado de secuencias significativas que se alinearon a la secuencia Snf7 insertada. Entre las mismas se destacó la secuencia descrita como “ESCRT-III subunit protein Snf7” (*Saccharomyces cerevisiae* S288c) con número de acceso NP_013125.1 por su mayor score, menor *E-value* y 100% de identidad. A través del número de acceso, ingresamos a la base de datos de proteínas de NCBI y a la sección “Homologs of the SNF7 gene” en la cual consta el análisis de la herramienta *HomoloGene* que detecta supuestos genes homólogos eucariotas descendientes de un ancestro común. Brevemente, el procesamiento que realiza el programa consta del alineamiento y

agrupamiento de las secuencias proteicas de organismos de entrada (cuyos genomas están completamente secuenciados y los genes correctamente anotados) con el objetivo de formar un árbol taxonómico que refleje cuán estrechas son las relaciones entre organismos entorno al gen analizado. De manera que, a través de esta herramienta se logra obtener un listado de organismos eucariotas cuyos genes homólogos se encuentran estrechamente relacionados a la secuencia de interés. Bajo este concepto, obtuvimos un listado de organismos eucariotas cuyos genes presentan el motivo Snf7 característico de la familia ESCRT: *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Canis lupus familiaris*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Danio rerio*, *Rattus norvegicus*, *Arabidopsis thaliana*, *Gallus gallus*, *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia proteica de cada organismo fue utilizada como templatado en la herramienta BLASTP de la base de datos de tripanosomátidos *TritypDB* (www.tritypdb.org) y las secuencias de mayor score y menor *E-value* de la cepa CL Brener fueron consideradas secuencias candidatas para TcVps32 de *Trypanosoma cruzi*. Se obtuvieron seis secuencias: tres pertenecientes al haplotipo Esmeraldo-like denominadas TcCLB.511589.250, TcCLB.509393.10 y TcCLB.511001.100 y tres pertenecientes al haplotipo Non-Esmeraldo-like denominadas TcCLB.511229.100, TcCLB.507491.140 y TcCLB.506957.110 (TABLA 1).

ESMERALDO-LIKE		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
TcCLB.511589.250	score	53,9	89,7
	<i>E-value</i>	2.10 ⁻⁸	4.10 ⁻²¹
	ID/Similitud (%)	27,3/51,4	33,3/54
TcCLB.509393.10	score	49,3	47,8
	<i>E-value</i>	1.10 ⁻⁸	3.10 ⁻⁶
	ID/Similitud (%)	20,6/42,9	20,3/39,8

TcCLB.511001.100	score	-	43,9
	E-value	-	5.10 ⁻⁵
	ID/Similitud (%)	-	25,9/44,9
NON-ESMERALDO-LIKE			
TcCLB.511229.100	score	53,9	90,9
	E-value	2.10 ⁻⁸	2.10 ⁻²¹
	ID/Similitud (%)	27,7/51,4	32,9/54
TcCLB.507491.140	score	49,7	46,6
	E-value	7.10 ⁻⁷	7.10 ⁻⁶
	ID/Similitud (%)	24,88/24,39	20,6/39,3
TcCLB.506957.110	score	-	43,9
	E-value	-	5.10 ⁻⁵
	ID/Similitud (%)	-	25,9/44,9

TABLA 1. Búsqueda de secuencias homólogas para TcVps32 mediante la herramienta Blastp de la base de datos TritypDB. Se exhiben los resultados obtenidos para *S. cerevisiae* y *H. Sapiens*, organismos cuyas Vps32 han sido ampliamente caracterizadas. Se restringió la búsqueda a la cepa CL Brener y se consideraron las secuencias con mayor score y menor E-value. Los porcentajes de identidad (%ID) y de similitud fueron obtenidos mediante *ClustalW* realizando un alineamiento global de a pares. En negrita se hallan resaltados los resultados de mayor score, E-value e identidad de cada secuencia. El listado completo de organismos analizados se encuentra en el apéndice I.

En la **TABLA 1** se puede visualizar, de manera general, que el número de secuencias encontradas difiere entre *S. cerevisiae* y *H. sapiens*, hecho que se repite con otros organismos analizados (Tabla apéndice I). Es decir, iniciando la búsqueda con la secuencia de *S. cerevisiae* se encontraron dos secuencias Esmeraldo-like y dos secuencias Non-Esmeraldo-like en *T. cruzi*, mientras que al iniciar la búsqueda con *H. sapiens*, se encontraron tres de cada haplotipo.

Al comparar las secuencias TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-

Esmeraldo-like con la secuencia de Vps32 de *Homo sapiens* (CHMP4B), se obtienen datos significativos de score (89,7 y 90,9 respectivamente) y de E-value (4.10^{-21} y 2.10^{-21} respectivamente). Asimismo, la identidad/similitud entre TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y CHMP4B fue de 33,3/54%, mientras que la identidad/similitud entre TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like y CHMP4B fue de 32,9/54%. Estos resultados fueron relevantes si se toma en cuenta que el alineamiento de las secuencias proteicas Snf7 (*S. cerevisiae*) y CHMP4B (*H. Sapiens*) mediante ClustalW, arrojó 37,9% de identidad y 54,3% similitud. Por lo tanto, estos resultados, podrían sugerir que las secuencias encontradas en *T. cruzi*, TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like, podrían ser potenciales candidatas a TcVps32. Hasta aquí es notable que estas secuencias presentaron mayor identidad con su ortólogo en *H. sapiens* (aproximadamente 33%) respecto a su ortólogo Snf7 de *S. cerevisiae* (27%) (**TABLA 1**).

Por otro lado, las secuencias TcCLB.509393.10 Esmeraldo-like y TcCLB.507491.140 Non-Esmeraldo-like presentaron similares valores de score y E-value; y mayor homología con Vps32 de *S. cerevisiae*; sin embargo, la identidad no superó el 30% (**TABLA 1**).

Finalmente, las secuencias TcCLB.511001.100 Esmeraldo-like y TcCLB.506957.110 Non-Esmeraldo-like son las únicas que se encontraron cuando la secuencia proteica CHMP4B (*H. sapiens*) se utilizó como templatado en TritypDB. Las mismas presentaron 25,9/44,9% de identidad/similitud con CHMP4B y los valores de score y E-value resultaron ser poco significativos (ambos de 5.10^{-5}) respecto a los obtenidos para las secuencias TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like (4.10^{-21} y 2.10^{-21} , respectivamente).

Por lo tanto, hasta este punto de nuestro análisis, las secuencias TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like podrían sugerirse como las candidatas más posibles para TcVps32 de *T. cruzi*.

Algo curioso que surge del análisis, es que, si se observan los valores de identidad, score y E-value, se evidencia cierta relación entre secuencias de haplotipos distintos lo cual será analizado en detalle a la brevedad.

Con el objetivo de profundizar el análisis, la presencia del motivo Snf7 en cada una de las secuencias fue confirmada a través de la herramienta predictora de regiones funcionales y dominios proteicos InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) y las posiciones abarcadas por este motivo fueron anotadas (**TABLA 1.2**). Paralelamente, se estableció la identidad entre secuencias del mismo haplotipo. Para ello, fueron analizadas de manera pareada y global mediante ClustalW las secuencias Esmeraldo-like TcCLB.511589.250, TcCLCLB.509393.10 y TcCLB.511001.100 por un lado, y las secuencias Non-Esmeraldo-like TcCLB.511229.100, TcCLB.507491.140 y TcCLB.506957.110 por el otro (**TABLA 1.2**).

CL Brener <i>Esmeraldo-like</i>					
ID/ Similitud (%)*	TcCLB.511589.250	TcCLB.509393.10	TcCLB.511001.100	Dominio (inicio- final) ***	Longitud de la proteína(aa) y gen (pb)
TcCLB.511589.250	100	21,8/44	25,2/45,9	Snf7 (29-202)	227 aa/ 684 pb
TcCLB.509393.10	21,8/44	100	19,9/41,4	Snf7 (29-202)	219 aa/ 660 pb
TcCLB.511001.100	25,2/45,9	19,9/41,4	100	Snf7 (11-201)	221 aa/ 666 pb

CL Brener <i>Non-Esmeraldo-like</i>					
ID/ Similitud (%)*	TcCLB.511229.100	TcCLB.507491.140	TcCLB.506957.110	Dominio (inicio- final) ***	Longitud de la proteína(aa) y gen (pb)
TcCLB.511229.100	100	22/43,2	24,8/45,9	Snf7 (29-202)	227 aa/ 684 pb
TcCLB.507491.140	22/43,2	100	21,1/39	Snf7 (28-202)	219 aa/ 660 pb
TcCLB.506957.110	24,8/45,9	21,1/39	100	Snf7 (11-201)	221 aa/ 666 pb

TABLA 2. Identidad/similitud de secuencias CL Brener Esmeraldo-like y CL Brener Non-Esmeraldo-like. Los alineamientos se realizaron con ClustalW (*). Se incluye los resultados obtenidos con la herramienta InterProScan (**) y las características genómicas de cada secuencia.

Tal como se observa en la **TABLA 2**, el análisis nos permitió confirmar que las secuencias miembros de un haplotipo no presentan identidad alguna entre sí. Entre las secuencias Esmeraldo-Like, TcCLB.511589.250 y TcCLCLB.509393.10 se evidenció 21,8/44% de identidad/similitud; entre TcCLB.511589.250 y TcCLB.511001.100 se obtuvo 25,2/45,9% de identidad/similitud y entre TcCLCLB.509393.10 y TcCLB.511001.100 se halló 19,9/41,4% de

identidad y similitud respectivamente. Cuando se analizaron las secuencias del haplotipo Non-Esmeraldo-like, entre las secuencias TcCLB.511229.100 y TcCLB.507491.140 la identidad/similitud fue 22/43,2% y entre TcCLB.511229.100 y TcCLB.506957.110 la identidad/similitud obtenida fue 24,8/45,9%; de la misma manera cuando se comparó TcCLB.507491.140 y TcCLB.506957.110 la identidad/similitud fue 21,1/39%. Estos resultados nos permitieron confirmar que las secuencias miembros de un mismo haplotipo no presentan identidad alguna entre sí.

Las secuencias candidatas TcVps32 de haplotipos distintos presentan características genéticas idénticas.

Cada secuencia fue analizada respecto a la descripción reportada en la base de datos y a las características génicas (longitud genómica/proteína, ubicación cromosómica, presencia y ubicación de dominios proteicos), las cuales curiosamente eran idénticas entre secuencias de haplotipos distintos (**TABLA 3**). La idéntica localización cromosómica observada entre secuencias de haplotipos distintos, nos permitió generar grupos de pares compuestos por una secuencia Non-Esmeraldo-like y una secuencia Esmeraldo-like. Con el objetivo de determinar la homología e identidad entre secuencias del mismo par, ambas fueron alineadas de manera global mediante el ClustalW. El primer par analizado compuesto por TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like arrojó 99,1% identidad y 100% similitud; el segundo par conformado por TcCLB.509393.10 Esmeraldo-like y TcCLB.507491.140 Non-Esmeraldo-like arrojó 97,7% de identidad y 98,6% de similitud; y por último el par compuesto por TcCLB.511001.100 Esmeraldo-like y TcCLB.506957.110 Non-Esmeraldo-like arrojó 100% de identidad y similitud (**TABLA 3**). Estos resultados confirmaron la estrecha relación entre secuencias de haplotipos distintos previamente observada, cuando se realizó la búsqueda de secuencias ortólogas en *T. cruzi* (**TABLA 1**).

TcVps32 Gene ID	haplotipo	descripción *	cromosoma	ubicación	Longitud de la proteína/ gen	ID/ Similitud (%)**
TcCLB.511589.250	CL Brener Esmeraldo- like	Snf7, putative	18	134,193..134,876 (-)	227 aa/ 684 pb	99,1/100
TcCLB.511229.100	CL Brener Non- Esmeraldo- like	Snf7, putative	18	134,205..134,888 (-)	227aa/ 684pb	
TcCLB.509393.10	CL Brener Esmeraldo- like	Snf7, putative	25	287,170..287,829 (-)	219aa/ 660pb	97,7/98,6
TcCLB.507491.140	CL Brener Non- Esmeraldo- like	Snf7, putative	25	287,449..288,108 (-)	219aa/ 660pb	
TcCLB.511001.100	CL Brener Esmeraldo- like	SNF-7-like protein, putative	38	156,337..157,002 (+)	221aa/ 666pb	100/100
TcCLB.506957.110	CL Brener Non- Esmeraldo- like	SNF-7-like protein, putative	38	56,232..156,897(+)	221aa/ 666pb	

TABLA 3. Grupos pares conformados por secuencias de haplotipos distintos. Se confeccionaron grupos pares, cada uno compuesto por una secuencia Esmeraldo-like y una secuencia Non- Esmeraldo-like de acuerdo con la identidad de secuencia, a la localización cromosómica y las características genómicas. La descripción corresponde a la anotación según TritypDB (*). La identidad y similitud (%) fueron calculados mediante ClustalW en un alineamiento pareado y global (**) y la ubicación del motivo Snf7, característico de la familia ESCRT, se determinó mediante InterProScan (***).

1.1 Análisis de estructura secundaria de las secuencias candidatas a TcVps32

Las proteínas del complejo ESCRT-III presentan hélices alfa (α) como estructuras secundarias, pero la cantidad de estas estructuras es variable entre los distintos organismos (Bajorek et al., 2009; Muzioł et al., 2006). Según se ha reportado, la estructura secundaria de la proteína Vps32 en humanos y en levaduras, está compuesta por seis hélices α y una región flexible (*Linker*) que une la última hélice (α_6) a la anteúltima (α_5) (Shim et al., 2007; Tang et al., 2015). Cada una de las hélices α que componen la estructura secundaria de Vps32 presenta un determinado punto isoeléctrico (pI), lo que globalmente genera una particular distribución de cargas. De esta

manera, las tres hélices hacia el extremo N-terminal (región N-terminal o NTR) presentan características básicas y las tres hélices restantes hacia el C-terminal (región C-terminal o CTR) presentan características ácidas. Tal como ha sido comentado, la interacción entre CTR y NTR de la proteína representan el estado cerrado o estructura monomérica de Vps32, mientras que la falta de interacción entre ambas regiones explicaría el estado polimérico y abierto de la proteína (Shim et al., 2007). Debido a que todas las secuencias presentan el motivo Snf7 característico de la familia ESCRT y teniendo en cuenta que los miembros del subcomplejo ESCRT-III tienen características particulares respecto a su estructura secundaria, cada secuencia fue analizada con la herramienta Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>), la cual permite predecir estructuras secundarias comparando la secuencia proteica insertada con todas las proteínas de estructura 3D conocidas anotadas en el *Protein Data Bank* (PDB). Al analizar cada una de las secuencias obtenidas para *T. cruzi* con la herramienta Jpred, se obtuvo un listado de estructuras que ya han sido caracterizadas e identificadas con un PDB ID, de manera que para cada secuencia se anotó la de menor E-value con su respectiva descripción (**TABLA 4**). Se observó que el par TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like presentó significativa homología con la estructura descrita como GH13992p, correspondiente a una estructura característica de la proteína Vps32 de *Drosophila melanogaster*, ortóloga de Snf7 de *S. cerevisiae* y CHMP4B de *H. sapiens*. Cuando se analizó el par TcCLB.509393.10 Esmeraldo-like y TcCLB.507491.140 Non-Esmeraldo-like, la descripción obtenida resultó poco precisa e informativa en este punto de análisis ya que fue descrita como “vacuolar sorting protein Snf7”. Algo distinto ocurrió con el par TcCLB.511001.100 Esmeraldo-like y TcCLB.506957.110 Non-Esmeraldo-like, en las que se predijo una estructura compatible con la proteína CHMP5, proteína miembro de la familia ESCRT-III (**TABLA 4**). la cual permite predecir estructuras secundarias comparando la secuencia proteica insertada con todas las proteínas de estructura 3D conocidas anotadas en el *Protein Data Bank* (PDB). Al analizar cada una de las secuencias obtenidas para *T. cruzi* con la herramienta Jpred, se obtuvo un listado de estructuras que ya han sido caracterizadas e identificadas con un PDB ID, de manera que, para cada secuencia, se anotó la de menor E-value con su respectiva descripción (**TABLA 4**). Se observó que el par TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like presentó significativa homología con la estructura anotada como GH13992p, correspondiente

a una estructura característica de la proteína Vps32 de *Drosophila melanogaster*, ortóloga de Snf7 de *S. cerevisiae* y CHMP4B de *H. sapiens*.

Cuando se analizó el par TcCLCLB.509393.10 Esmeraldo-like y TcCLB.507491.140 Non-Esmeraldo-like, la descripción obtenida resultó poco precisa e informativa en este punto del análisis ya que fue descrita como “*vacuolar sorting protein Snf7*”. Algo distinto ocurrió con el par TcCLB.511001.100 Esmeraldo-like y TcCLB.506957.110 Non-Esmeraldo-like, en las que se predijo una estructura compatible con la proteína CHMP5, proteína miembro de la familia ESCRT-III de *H. sapiens* (TABLA 4).

CL Brener TcVps32 Gene ID	Jpred (secondary structure)
TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like	GH13992p shrub, fly ortholog of snf7/chmp4b
TcCLB.511229.100 Non- Esmeraldo-like	
TcCLB.509393.10 Esmeraldo-like	Vacuolar-sorting protein SNF7
TcCLB.507491.140 Non- Esmeraldo-like	
TcCLB.511001.100 Esmeraldo-like	Charged Multivesicular body protein 5
TcCLB.506957.110 Non- Esmeraldo-like	

TABLA 4. Predicción de estructura secundaria de las putativas proteínas homólogas a TcVps32 de *T. cruzi*. Se detalla cada una de las descripciones asociadas a un PDB ID (Protein Data Bank) al insertar la secuencia en la herramienta Jpred. Para las secuencias TcCLB.511001.100 Esmeraldo-like y TcCLB.506957.110 se predijo una estructura compatible a la de la proteína CHMP5, proteína asociada a ESCRT-III.

Las estructuras secundarias de las secuencias candidatas TcVps32 están compuesta por hélices α , cuya cantidad y distribución de cargas es distinto para cada grupo de secuencias.

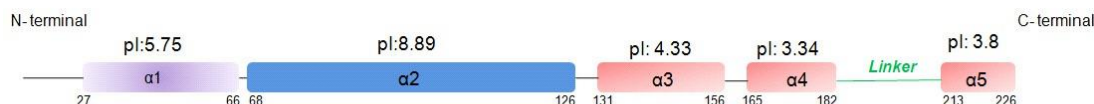
A través de los gráficos de estructura secundaria obtenidos, se pudo confirmar la presencia de hélices α (FIGURA 1). Particularmente en el “*Par 1*” (TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like /TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like) y el “*Par 2*” (TcCLCLB.509393.10 Esmeraldo-like/TcCLB.507491.140 Non-Esmeraldo-like), se pudieron identificar cinco hélices α y el *Linker* CTR, que establece la unión de las últimas dos hélices α (α_4 y α_5). De manera que, para estos dos pares de secuencias, se pudo confirmar la presencia de una estructura secundaria compatible a la descrita en Vps32 de *H. sapiens* y *S. cerevisiae* (Shim et al., 2007). En el caso del “*Par 3*” (TcCLB.511001.100 Esmeraldo-like/TcCLB.506957.110 Non-Esmeraldo-like), sólo

se observaron tres hélices α sin la presencia del *Linker* CTR.

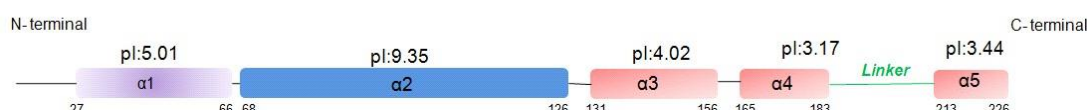
Ya que una de las características importantes para la funcionalidad de la proteína deriva de la naturaleza química de las hélices α , procedimos a determinar los puntos isoeléctricos (pI) de cada una de ellas y, para tal fin, utilizamos dos herramientas: Compute pI/Mw de ExPASy y *Protein Isoelectric Point* de SMS (*Sequence Manipulation Suite*) (**FIGURA 1**).

- **Par 1 (Identidad/similitud entre secuencias: 99,1/100%)**

Esmeraldo-like TcCLB.511589.250

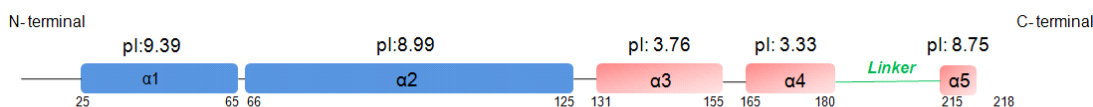


Non Esmeraldo-like TcCLB.511229.100

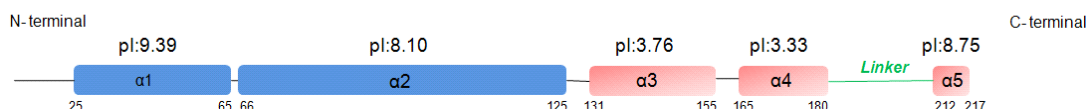


- **Par 2 (Identidad/ similitud entre secuencias: 97,7/98,6%)**

Esmeraldo-like TcCLB.509393.10

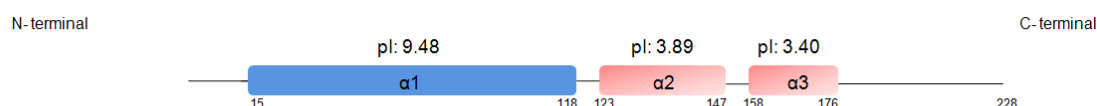


Non Esmeraldo-like TcCLB.507491.140



- **Par 3 (Identidad/similitud entre secuencias: 100/100%)**

Esmeraldo-like TcCLB.511001.100



Non Esmeraldo-like TcCLB.506957.110

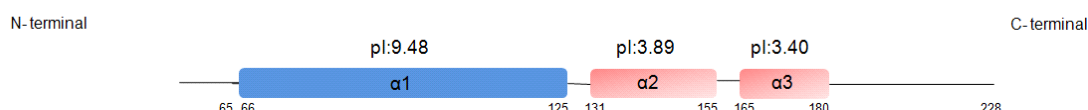


FIGURA 1. Estructuras secundarias de las duplas alélicas Esmeraldo-like y Non-Esmeraldo-like candidatas a TcVps32. Cada par de secuencias se encuentra conformado por una secuencia de haplotipo Esmeraldo-like y Non-Esmeraldo like, las cuales presentan, entre sí, el porcentaje de

identidad/similitud especificada. La estructura secundaria de cada secuencia se encuentra compuesta por hélices α con punto isoeléctrico (pI) determinado. **A.** Grupo par compuesto por TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like: presenta las hélices α descriptas y la distribución de cargas característica (ver texto). **B.** Grupo par TcCLCLB.509393.10 Esmeraldo-like y TcCLB.507491.140 Non-Esmeraldo-like: presenta las características hélices α , la región *Linker* CTR y una distribución de cargas inusual, ya que las hélices de ambos extremos presentan características básicas. **C.** Grupo par compuesto por TcCLCLB.509393.10 Esmeraldo-like y TcCLB.507491.140 Non-Esmeraldo-like: se observan tres hélices α sin la presencia de *Linker* CTR.

A pesar de que las secuencias del “Par 3” (TcCLB.511001.100 Esmeraldo-like y TcCLB.506957.110 Non-Esmeraldo-like) presentan un NTR básico (hélice α de pI de 9,48) y un CTR (dos hélices α) ácido, estas secuencias no pueden ser consideradas candidatas para TcVps32, ya que su estructura está compuesta sólo por tres hélices α y se hace evidente la ausencia del *Linker* CTR (**FIGURA 1.1**). En el “Par 2” compuesto por las secuencias TcCLCLB.509393.10 Esmeraldo-like y TcCLB.507491.140 Non-Esmeraldo-like, si bien se identificó una estructura compuesta por cinco hélices α y el *Linker* CTR, la distribución de cargas observada fue irregular. Es decir, las hélices internas presentaron un pI menor a 5 y el NTR y CTR presentaron un pI de 9,39 y 8,75 respectivamente (**FIGURA 1.1**). Por último, las estructuras de las secuencias del “Par 1” (TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like) presentan 5 hélices α en total: un CTR compuesto por tres hélices α de características ácidas y un NTR que comienza con una hélice α de pI entre 5-6 y continúa con una hélice de pI básico (8,89 en TcCLB.511589.250 y 9,35 en TcCLB.511229.100 (**FIGURA 1**). Es decir, a pesar de que la primera hélice α presenta un pI menor a 6, se observa una tendencia en la que el NTR presenta características químicas básicas y el CTR, características ácidas. Entonces, de manera general se observa que se conserva la distribución de cargas descrita en Vps32.

Además de la distribución de cargas, se observa que el CTR está compuesto por tres hélices α , tal como se observa en otros organismos. Teniendo en cuenta que estas hélices del CTR en Snf7 de *S. cerevisiae* y CHMP4B de *H. sapiens*, actúan como dominios regulatorios de la proteína (Shim et al., 2007), es probable que en TcVps32, esta región pueda cumplir la misma función. En conclusión, este hallazgo nos podría indicar la existencia de la conservación funcional del CTR de TcVps32 de *T. cruzi*. Para más detalles, en la “**Análisis estructural TcVps32 de *T. cruzi* y TbVps32 de *T. brucei*, Sección 2.2.2 Análisis estructural focalizado: Motivos**” se

abordará el análisis del CTR de TcVps32.

1.2 Búsqueda del motivo MIM del CTR en las secuencias candidatas TcVps32.

En el CTR de ciertas proteínas miembros de ESCRT-III y ESCRT-III-like proteins de *S. cerevisiae*, se ha reportado el Motivo MIM (*MIT- Interacting Motif*), cuya secuencia consenso (D/E)xxLxxRLxxL(K/R), está compuesta por seis aminoácidos conservados (Obita et al., 2007). Tal como se observa en la **FIGURA 2**, para el análisis de este motivo, los autores asignaron un número de orden a cada aminoácido de la secuencia, respecto a una posición central (orden 0) que se corresponde con el residuo arginina (R). De esta manera, se generó el ordenamiento de posiciones -2, -1, 0, +1, +2 y +3 para cada aminoácido conservado, siendo R la posición central (**FIGURA 2A**). El alineamiento de la región CTR de las proteínas ESCRT-III de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*, permitió a los autores determinar la conservación del motivo MIM en Vps2, Did2 y Vps24, evidenciándose los residuos antes detallados en sus correspondientes posiciones. En proteínas como Vps32/Snf7, Vps60 (CHMP5) y Vps20 (CHMP6) se observó divergencia del motivo MIM, reflejada en algunos cambios de aminoácidos en las posiciones detalladas (Obita et al., 2007).

Con el objetivo de identificar el motivo MIM en las secuencias halladas y, especialmente en el “*Par 1*” (TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like) que exhibe todas las características de Vps32, se realizó un alineamiento múltiple y global mediante Clustal Omega incluyendo las secuencias proteicas de *S. cerevisiae* y *H. sapiens* que presentan el motivo MIM conservado: Vps2, Did2, CHMP1A, CHMP1B y CHMP2A.

En el alineamiento también se incluyeron las secuencias proteicas de miembros de ESCRT-III cuyos motivos MIM han sido descritos como divergentes por no respetar completamente la secuencia consenso. Dentro de esta clasificación, Vps32 (Snf7) de *S. cerevisiae* es la proteína que presenta una secuencia MIM de mayor grado de conservación respecto a otros miembros de ESCRT-III (Vps60 y Vps20) y a su contraparte en *H. sapiens*, CHMP4B (**FIGURA 1.2B**).

A.

		-2	-1	0+1	+2+3	
		218	224	229		
Sc	Vps2	.NPDDDLQARLNTLKKQT				232
Sc	Did2	.EKEDKLAQRLRALRG				204
Hs	CHMP1A	.SQEDQLSRRLAALRN				196
Hs	CHMP1B	.AEQDELSQLARLRDQV				199
Hs	CHMP2A	.DADADLEERLKNLRRD				222
Hs	CHMP2B	.ISDEEIERQLKALGVD				213
Hs	Vps24	.EALAMQSRLATLRS				222
Sc	Vps24	.RMVNEMRELRALQN				224
Sc	Snf7	.DEEDEDEKALRELQAEMGL				240
Hs	CHMP4A	.PKVDEDEEALKQLAEWVS				222
Hs	CHMP4B	.KKKEEEDDDMKELNAGSM				224
Hs	CHMP4C	.QRAEEEDDDIKQLAAWAT				233
Hs	CHMP5	.DTKNKDGVLVDEFGLPQIPAS				219
Sc	Vps60	.EPNLDTEDEKNKALESAQ				229
Sc	Vps20	.EERSDTKEPLALLLS				221
Hs	Vps20	.VKARPRQAEELVAAS				201

B.

		-2	-1	0+1	+2+3	
		↓	↓	↓	↓	
DID2		KEDKLAQRLRALRG*				204
CHMP1a		QEDQLSRRLAALRN				196
CHMP1b		EQDELSQLARLRDQV				199
Vps2		PDDDLQARLNTLKKQT				232
CHMP2a		ADADLEERLKNLRRD				222
TcCLB.511001.100		---EETVDPYSLETQLGL				221
TcCLB.506957.110		---EETVDPYSLETQLGL				221
TcCLB.509393.10		-----GLS---A----				219
TcCLB.507491.140		-----GLS---A----				219
Snf7		EEDEDEKALRELQAEMGL				240
TcCLB.511589.250		KEDEDEEALRALEAELQS				227
TcCLB.511229.100		EEDEDEEALRALEAELQS				227

FIGURA 2. Motivo MIM. A Las secuencias proteicas por encima de la línea negra corresponde a proteínas ESCRT-III cuyos motivos MIM, (D/E) xxLxxRLxxL (K/R), se encuentran conservados y manteniendo las posiciones que se detallan en la figura entorno a una posición 0 (cero) o central que corresponde al aminoácido arginina (R). Por debajo de la línea, se detallan las proteínas cuyos motivos MIM divergen respecto a las secuencias por encima de la línea negra divisoria. **B** Búsqueda de motivo MIM en las secuencias candidatas TcVps32. El alineamiento global y múltiple realizado mediante Clustal Omega demuestra que se mantiene la posición +1 y +2, ambas correspondientes a Leu (L) y en las posiciones -2, -1, y 0 se observan aminoácidos idénticos al motivo MIM de Snf7 (Vps32) en las secuencias TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like.

En proteínas cuyos motivos MIM se encuentran conservados (Vps2, Did2, CHMP1A, CHMP1B y CHMP2A), se puede observar a la arginina (R) en la posición 0 (cero) o central. En esta posición,

Snf7 presenta una alanina (A) al igual que las secuencias del “Par 1”, TcCLB.511589.250 y TcCLB.511229.100. En las posiciones +1 y +2 se observa la presencia de leucina (L) en todo el listado de secuencias y en la posición -1 nuevamente se observa diferencia entre las secuencias candidatas TcVps32 y las secuencias proteicas cuyo motivo MIM está más conservado. Es decir, mientras estas últimas exhiben leucina en esta posición, Snf7 y las secuencias TcCLB.511589.250 y TcCLB.511229.100 presentan aspartato (D).

Por lo tanto, se podría concluir que las secuencias del “Par 1” (TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like) presentan un motivo MIM idéntico al reportado en Snf7 de *S. cerevisiae*, mientras que, el “Par 2” (TcCLB.509393.10 Esmeraldo-like/ TcCLB.507491.140 Non-Esmeraldo-like) y el “Par 3” (TcCLB.511001.100 Esmeraldo-like/ TcCLB.506957.110 Non-Esmeraldo-like) no lo presentan. Por lo tanto, los pares de secuencia 2 y 3 no continuarán siendo incluidos en los futuros análisis debido a que no presentan una estructura secundaria compatible con la reportada para Vps32 y tampoco poseen el característico motivo MIM de la subfamilia ESCRT-III (**FIGURA 1C, FIGURA 2 y TABLA 4**).

1.3 Análisis de identidad y similitud entre secuencias y proteínas miembros de ESCRT-III.

Con el objetivo de confirmar si las secuencias del único par candidato “Par 1” (TcCLB.511589.250/ TcCLB.511229.100) se corresponden a TcVps32 de *T. cruzi*, se realizó el alineamiento de estas con las secuencias proteicas de CHMP6/Vps20 y CHMP5/Vps60, proteínas miembros de ESCRT-III que exhiben en motivo MIM (Obita et al., 2007). Asimismo, se incluyó a las secuencias proteicas de CHMP4A y CHMP4C (isoformas de la proteína Vps32 humana) (**TABLA 5**). Teniendo en cuenta que, entre la secuencia TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y la secuencia TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like, existe 99% de identidad y 100% de similitud, para simplificar el análisis sólo se incluyó la secuencia TcCLB.511589.250.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
ID/Similitud (%) *	Snf7	Vps60	Vps20

TcCLB.511589.250 CL Brener Esmeraldo-like	27,3/51,4	22,5/47,1	22/41,9		
<i>Homo sapiens</i>					
ID/Similitud (%) *	CHMP4a	CHMP4B	CHMP4C	CHMP5	CHMP6
TcCLB.511589.250 <i>CL Brener Esmeraldo-like</i>	33,8/53,8	33,3/54	29,3/49,4	24/48	23,1/45

TABLA 5. Análisis de Identidad/similitud de la secuencia TcCLB.511589.250 CL Brener Esmeraldo-like y otras proteínas miembros ESCRT-III. Los alineamientos se realizaron con ClustalW (*).

En la **TABLA 5** se puede observar que la secuencia TcCLB.511589.250 presenta mayor homología con las secuencias correspondientes a Vps32: CHMP4A, CHMP4B y Snf7. Si se compara el resultado entre organismos, se evidencia mayor homología con CHMP4, versión humana de Vps32, respecto de su ortólogo Snf7. En cuanto a las isoformas de CHMP4, se observó 33,3%/54% de identidad/similitud con CHMP4B y 33,8%/54% identidad/similitud con CHMP4A, resultado significativo teniendo en cuenta que la identidad entre Snf7 y CHMP4B es de 37,9/54,3% y entre Snf7 y CHMP4A la identidad/similitud es 38/55% (**TABLA 3, Apéndice**). Por otro lado, se puede observar que la identidad/similitud entre TcCLB.511589.250 y CHMP6 es de 23,1%/45% de identidad/similitud y este resultado se aproxima al que se obtiene cuando CHMP6 se compara con CHMP4B (identidad/similitud de 22,9%/47,2%) (**TABLA 3A; Apéndice**).

Por lo tanto, las secuencias candidatas elegidas para TcVps32 de *T. cruzi* son TcCLB.511589.250 y TcCLB.511229.100 debido a la significativa homología exhibida con las secuencias ortólogas Snf7 y CHMP4.

1.4 Análisis del contexto genómico de candidatos TcVps32: las secuencias TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like constituyen el par alélico TcVps32 de *T. cruzi*.

Con el objetivo de determinar si estas secuencias constituyen un par alélico para TcVps32, se evaluó el contexto genómico de ambas secuencias. Para ello, las secuencias proteicas de los

genes ubicados 5' *upstream* y 3' *downstream* de los genes candidatos TcVps32 fueron anotadas con la respectiva descripción según la base datos TriTrypDB (**TABLA 6 superior**). A través de este análisis se determinó que los genes 5' *upstream* y 3' *downstream* de las secuencias Esmeraldo-like y Non-Esmeraldo-like, coinciden entre sí, mostrando una organización sinténica (**TABLA 4**). Bajo este concepto, se evaluaron los porcentajes de identidad (ID%) de estas secuencias proteicas mediante ClustalW y la presencia de dominios o motivos mediante la herramienta InterProScan (**TABLA 1.6 inferior**). Las secuencias proteicas 5' *upstream* (TcCLB.511589.230 / TcCLB.511229.80) mostraron una identidad/similitud del 99,7/99,7% y las secuencias proteicas de los genes 3' *downstream* (TcCLB.504017.70/TcCLB.511229.120) arrojaron 47,2/47,6% de identidad/similitud.

TcVps32 Gene ID	Haplotipo	Upstream Gene ID	Descripción*	Downstream Gene ID	Descripción*
TcCLB.511589.250	CL Brener Esmeraldo-like	TcCLB.511589.230	Eukaryotic translation initiation, factor 3 subunit i	TcCLB.504017.70	hypothetical protein
TcCLB.511229.100	CL Brener Non-Esmeraldo- like	TcCLB.511229.80	Eukaryotic translation initiation, factor 3 subunit i	TcCLB.511229.120	hypothetical protein

Upstream Gene ID	Dominio ***	ID/Similitud (%)	Downstream Gene ID	Domain ***	ID/ Similitud (%)
TcCLB.511589.230	WD domain, G-beta repeat	99,7/99,7	TcCLB.504017.70	not founded	47,2/47,6
TcCLB.511229.80	WD domain, G-beta repeat		TcCLB.511229.120	not founded	

TABLA 6. Contexto genómico de candidatos TcVps32. En la tabla se especifican los Gene ID de cada secuencia downstream 3' y upstream 5' a los genes candidatos TcVps32 con sus respectivas descripciones según TriTrypDB (*), análisis de identidad de secuencia (%ID) realizado con la herramienta ClustalW y la presencia de dominios proteicos predichos con la herramienta InterProScan (***).

Estos resultados confirmaron el hallazgo de un par alélico para TcVps32 ubicado en el cromosoma 18, compuesto por las secuencias TcCLB.511589.250 del haplotipo Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 del haplotipo Non-Esmeraldo-like. Como consecuencia, cada secuencia es un alelo proveniente de cada uno de los parentales que conforman la cepa híbrida CL Brener, haplotipo Non-Esmeraldo-like (linaje III) y haplotipo Esmeraldo-like (linaje II).

1.5 Amplificación de los genes y confirmación de la identidad

El par alélico TcVps32, conformado por las secuencias TcCLB.511589.250 y TcCLB.511229.100, fue utilizado como templado para elaborar los oligonucleótidos correspondientes a fin de amplificar la secuencia codificante para TcVps32. Es así como, a partir del DNA genómico de la cepa Y de *T. cruzi*, se amplificó por PCR el gen denominado, formalmente de aquí en adelante, como TcVps32. El único fragmento obtenido (**FIGURA 3A**) fue subclonado en el vector pGEM-T Easy y, posteriormente, los distintos clones obtenidos fueron secuenciados con el fin de obtener una secuencia consenso del gen. Es así como las secuencias genómicas de cada uno de los clones obtenidos por secuenciación fueron alineadas globalmente con las secuencias del par alélico utilizado como templado. A través de este análisis, se obtuvo un único gen TcVps32, el cual fue corroborado al introducirlo en la base de datos del genoma de *T. cruzi* (TritrypDB). Posteriormente, la secuencia proteica TcVps32 fue sometida al alineamiento conjunto con las secuencias proteicas del par alélico utilizado como templado. De esta manera, se evidenció mayor homología entre la secuencia TcVps32 y la secuencia del haplotipo Non-Esmeraldo-like (identidad fue 99,6% y la similitud de 100%), respecto a la secuencia Esmeraldo-like (**FIGURA 3B y TABLA 7**). En la secuencia TcVps32 se observa un aminoácido de histidina (H) en la posición 62 en vez de tirosina (Y), tal como se observa en ambas secuencias TcCLB.511589.250 y TcCLB.511229.100.

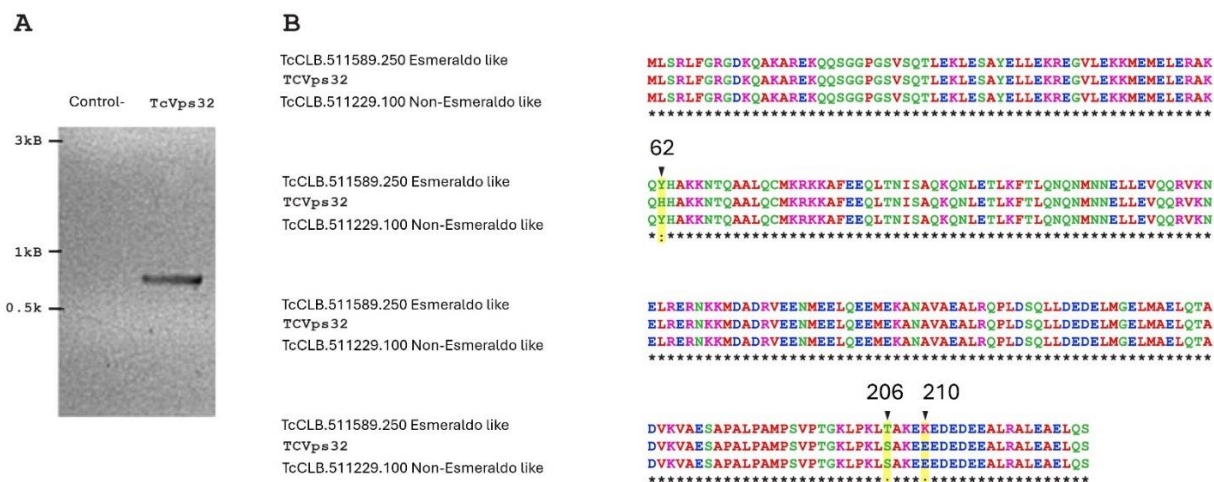


FIGURA 3. Amplificación del gen TcVps32. **A.** Producto de amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos para TcVps32 de *T. cruzi*. **B.** La secuencia obtenida por amplificación y secuenciación del gen TcVps32 fue comparada por alineamiento con las secuencias del par alélico Esmeraldo y Non Esmeraldo like. La secuencia TcVps32 presenta los mismos aminoácidos en las posiciones 206 y 210 que la secuencia TcCLB.511229.100 Non Esmeraldo, mientras que en la posición 62 no hubo coincidencia entre la secuencia TcVps32 y las secuencias del par alélico Esmeraldo y Non Esmeraldo.

ID/Similitud (%) *	TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like
TcVps32	98,7/100	99,6/100

TABLA 7. Amplificación del gen TcVps32. Porcentajes de Identidad y similitud (ID/Similitud %) entre las secuencias de aminoácidos del par alélico candidato a TcVps32 utilizado como templado y la secuencia TcVps32 obtenida por secuenciación.

2. TbVps32 de *Trypanosoma brucei*

2.1 Identificación de los genes TbVps32 en *Trypanosoma brucei*

La búsqueda bioinformática de la secuencia candidata TbVps32 se realizó a través de la herramienta BLASTP de la base de datos de tripanosomátidos TritypDB (www.tritypdb.org) utilizando como templado la secuencias Vps32 de *Saccharomyces cerevisiae* (NP_013125.1) (Rothman et al., 1989) y las secuencias del par alélico TcVps32, TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like. La búsqueda se restringió a la cepa Lister 427 evaluando las 2 versiones disponibles de su genoma, Lister 427 y Lister 427 2018. De esta manera se obtuvieron dos secuencias candidatas para TbVps32: Tb427tmp.11.1390 y Tb427_110104600.1 (**TABLA 8**).

Lister 427		<i>S. cerevisiae</i> NP_013125.1	<i>T. cruzi</i> TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like	<i>T. cruzi</i> TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo like
Tb427tmp.11.1390	score		201	201
	E-value	5.10 ⁻²¹	2.10 ⁻⁶³	2.10 ⁻⁶³
	ID (%) /Similitud	27,9/51,8	55,6/69	55,6/69
Lister 427 2018				
Tb427_110104600.1	score	91,3	201	201
	E-value	1.10 ⁻²¹	1.10 ⁻⁶³	1.10 ⁻⁶³
	ID (%) /Similitud	28,3/52,2	55,6/69,4	55,6/69,4

TABLA 8. Búsqueda bioinformática de las secuencias candidatas TbVps32 en *T. brucei*. La búsqueda en BLASTP se llevó a cabo utilizando como templatado las secuencias Vps32 de *S. cerevisiae* (NP_013125.1) y las secuencias del par alélico TcVps32 (TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like), restringiendo la búsqueda a las cepas Lister 427 y Lister 427 2018. Ambas secuencias comparten los valores de score, E-value e identidad.

Con la presunción que la diferencia entre las secuencias radica en la anotación de estas, ya que la secuencia Tb427_110104600.1 (Lister 427 2018) deriva de la secuenciación realizada en 2018 de la misma cepa Lister 427 (https://tritypdb.org/tritypdb/app/record/organism/TMPTX_tbruLister427_2018), se realizó el alineamiento global de ambas secuencias obtenidas en TritypDB. De esta manera, las secuencias TryTb427tmp.11.1390 y Tb427_110104600.1 fueron analizadas mediante ClustalW, observándose que ambas secuencias comparten los valores de score, E-value e identidad. Paralelamente, se analizaron las descripciones que constan sobre ambas secuencias en la base de datos TritypDB. La secuencia Tb427tmp.11.1390 fue descrita como una proteína hipotética conservada mientras que Tb427_110104600.1 fue anotada como una proteína Snf7 putativa, ambas de 228 aminoácidos cuyas secuencias genómicas constan de 687 pb localizadas en el cromosoma 11.

El resultado del alineamiento entre Tb427tmp.11.1390 y Tb427_110104600.1 arrojó 99,6% de identidad y 99,6% de similitud y, en ambas secuencias, fue confirmada la presencia del motivo Snf7 mediante la herramienta InterProScan (**TABLA 9 y FIGURA 4**).

TbVps32 Gene ID	Descripción *	Cromosoma	Ubicación	Longitud de la proteína /gen	Domini o inicio-final ***	ID/ Similitud (%) ***
Tb427tmp.11.1390	Hypothetical protein, conserved	11	2,566,289..	228 aa/	Snf7	99,6/99,6
Lister 427			2,566,975(-)	687 pb	26-212	
Tb427_110104600.1	Snf7 putativa	11	2,635,395..2,636,081(-)	228 aa/	Snf7	99,6/99,6
Lister 427 2018				687 pb	26-212	

TABLA 9. Búsqueda de la secuencia candidata TbVps32. Comparación de las dos secuencias halladas en TritrypDB: Tb427tmp.01.1390 Lister 427 y Tb427_110104600.1 Lister 427 2018. A. Descripción de las secuencias según la base de datos TritrypDB, análisis de identidad/similitud entre ambas mediante Clustal W e identificación del motivo Snf7 mediante la herramienta InterProScan.

Tb427_110104600.1	MFGRLFGFKSSQ	EAPRPGVSPGRPNSSLEELQSKLELLEKREGVLT	KKVEDELAKAREFY	60
Tb426tmp.01.1390	MFGRLFGFKSSQ	EAPRPGVSPGRPNSSLEELQSKLELLEKREGVLT	KKVEDELAKAREFY	60

Tb427_110104600.1	SKKNKSMALQCMKRKKMAEDELTKIACQKQNLDTLIFTLQNTMNMEVLAAQKRAKDELK			120
Tb426tmp.01.1390	SKKNKSMALQCMKRKKMAEDELTKIACQKQNLDTLIFTLQNTMNMEVLAAQKRAKDELK			120

Tb427_110104600.1	LVNKKMDADGVDNTMDELLEEMDKVNAVSEALRQPLDAQVVEDELLAELTEEMNEVGIS			180
Tb426tmp.01.1390	LVNKKMDADGVDNTMDELLEEMDKVNAVSEALRQPLDAQVVEDELLAELTEEMNEVGIS			180

	195			
	↓			
Tb427_110104600.1	QTTTATMAPAALLPSMPGV	PQNDLPQH	PNKAVDEEEALRALERE	228
Tb426tmp.01.1390	QTTTATMAPAALLPXMPGV	PQNDLPQH	PNKAVDEEEALRALERE	228

FIGURA 4. Alineamiento de secuencias candidatas a TbVps32 Tb427tmp.01.1390 Lister 427 y Tb427_110104600.1 Lister 427 2018. El alineamiento de a pares y global fue realizado mediante Clustal W y resultó en un 99,56% de identidad con la presencia de una serina (S) en la posición 195 de Tb427_110104600.1 y un residuo no determinado (X) en la misma posición de Tb427tmp.01.1390.

Al analizar el alineamiento, se observa que ambas secuencias son idénticas excepto por la presencia de un aminoácido serina (S) en la posición 195 de la secuencia Tb427_110104600.1 y un residuo no determinado (X) en la secuencia Tb427tmp.11.1390 en la misma posición.

Como la diferencia resulta ser puntual, es probable que la diferencia entre ambas secuencias

radique en que la secuencia anotada como Tb427_110104600.1 surge de la nueva secuenciación sobre la cepa Lister 427 realizada en el 2018 en la cual, a su vez, se resuelve la identidad del aminoácido no determinado en la posición referida.

2.2 Análisis del contexto genómico de los candidatos TbVps32

Con el objetivo de profundizar el análisis y teniendo en cuenta la significativa homología entre secuencias, el análisis se focalizó en el contexto genómico de ambas secuencias, Tb427tmp.11.1390 y Tb427_110104600.1. Cada una de las secuencias 5' upstream y 3' downstream al gen candidato TbVps32 fueron anotadas según la descripción aportada por la base datos TritypDB. Paralelamente, cada secuencia fue analizada con la herramienta InterProScan para confirmar la presencia de dominios o motivos, o en su defecto, para detectarlos en aquellas secuencias en las que no existía información alguna (**TABLA 10**).

A.

TbVps32 Gene ID	Upstream Gene ID	Descripción *	Downstream Gene ID	Descripción *
Tb427tmp.11.1390	Tb427tmp.01.1400	glycyl-tRNA synthetase, putative	Tb427tmp.01.1380	hypothetical protein, conserved
Tb427_110104600.1	Tb427_110104700	tRNA synthetase class II core domain (G, H, P, S and T)/ Anticodon binding domain containing protein, putative	Tb427_110104500	Leucine Rich repeat, putative

B.

Upstream Gene ID	Domain ***	ID/ Similitud (%)	Downstream Gene ID	Domain ***	ID/ Similitud (%)
Tb427tmp.01.1400	Anticodon binding domain, tRNA synthetase class II core domain (G, H, P, S and T)	99,7/99,7	Tb427tmp.01.1380	Leucine rich repeat	99,7/99,7
Tb427_110104700			Tb427_110104500		

TABLA 10. Contexto genómico de las secuencias candidatas TbVps32: Tb427tmp.01.1390 Lister 427 y Tb427_110104600.1 Lister 427 2018. A. Descripción de las secuencias 5' upstream (violeta) y 3' downstream (fucsia) de las secuencias candidatas TbVps32 según la base de datos TritypDB. **B.** Comparación de las secuencias upstream (violeta) y downstream (fucsia) a cada una de las secuencias TbVps32: identificación de dominios mediante la herramienta InterProScan y análisis de identidad/similitud mediante Clustal W.

Posteriormente, se llevaron a cabo los alineamientos de las secuencias 5' upstream por un lado y 3' downstream por el otro. De esta manera, las secuencias 5' upstream a cada uno de los genes candidatos TbVps32 presentaron 99,7% de identidad y 99,7% de similitud, las cuales además compartían dominios ricos en leucina (*Leucine rich repeats*) (**TABLA 2.2 B**). Las secuencias 3' downstream de cada gen TbVps32 candidato, mostraron 99,7/99,7% de identidad/similitud entre sí, las cuales compartían los dominios *Anticodon binding domain* y *tRNA synthetase class II core domain* (G, H, P, S y T). De manera que en base al análisis de las secuencias y a su contexto genómico, pudimos concluir que Tb427tmp.11.1390 y Tb427_110104600.1 constituyen una única versión TbVps32 y por ello para los análisis subsiguientes, decidimos seguir de aquí en adelante con la secuencia Tb427_110104600.1, producto de la secuenciación de la cepa Lister 427 en el 2018.

2.3 Análisis de Identidad y similitud entre secuencia candidata TbVps32, Snf7 y CHMP4B

En la **TABLA 11**, se observa que la secuencia candidata a TbVps32 (Tb427_110104600.1) presenta valores de identidad de 28,3% y similitud del 52,2% respecto a la secuencia Snf7 de *S. cerevisiae*, lo cual señala una homología significativa teniendo en cuenta que la identidad/similitud calculada entre Snf7 y la secuencia TcVps32 (TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like) es de 27,3%/51,4%. Adicionalmente, la secuencia candidata a TbVps32 presenta mejor alineamiento y mayor homología con el par alélico TcVps32 de *T. cruzi* (identidad/similitud de 55,6%/69,4%).

Lister 427 2018		<i>S. cerevisiae</i> NP_013125.1	<i>T. cruzi</i> TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like	<i>T. cruzi</i> TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo like
Tb427_110104600.1	ID /Similitud (%)	28,3/52,2	55,6/69,4	55,6/69,4

TABLA 11. Búsqueda bioinformática de las secuencias candidatas TbVps32 en *T. brucei*. La búsqueda en BLASTP se llevó a cabo utilizando como templatado las secuencias Vps32 de *S. cerevisiae* (NP_013125.1) y las secuencias del par alélico TcVps32 (TcCLB.511589.250 Esmeraldo-like y TcCLB.511229.100 Non-Esmeraldo-like), restringiendo la búsqueda a las cepas Lister 427 y Lister 427 2018. Ambas secuencias comparten los valores de score, E-value e identidad.

Para profundizar el análisis, y aplicando el mismo criterio que en la búsqueda de los genes TcVps32, se procedió a comparar la secuencia Tb427_110104600.1 con las secuencias proteicas de varios organismos eucariotas cuyos genes son ortólogos de Snf7 de *S. cerevisiae*. El resultado del alineamiento arrojó valores de identidad (ID%) que rondan entre el 25% y el 33% (el listado completo se encuentra en el **Apéndice I Tabla1**). Para simplificar los resultados de esta búsqueda, la **TABLA 12** detalla los resultados al comparar la secuencia candidata (TbVps32Tb427_110104600.1), con CHMP4B (NP_789782.1) de *H. sapiens*, obteniéndose una identidad/similitud de 31,5%/50%. Este valor resulta significativo si se comparan los valores 37,9% de identidad y 54,3% de similitud entre Snf7 y CHMP4B (**TABLA 3 Apéndice I**) y el 33,3% de identidad y 54% de similitud entre CHMP4B y TcCLB.511589.250 de *T. cruzi* (haplotipo Esmeraldo-like del par alélico TcVps32) (**TABLA 1**). Estos resultados, por lo tanto, evidenciaron que la secuencia TbVps32 elegida es una candidata potencial a TbVps32 en *T. brucei*.

Lister 427 2018		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Snf7 NP_013125.1	<i>Homo sapiens</i> CHMP4B NP_789782.1
Tb427_110104600.1	score	91,3	84
	E-value	1.10 ⁻²¹	4.10 ⁻¹⁹
	ID (%)	28,3/52,2	31,5/50

TABLA 12. Análisis de Identidad/Similitud de las secuencias candidatas TbVps32. Se realizó la comparación entre las secuencias candidatas TbVps32, Tb427tmp.11.1390 y Tb427_110104600.1, y las secuencias proteicas de varios organismos eucariotas cuyos genes son ortólogos de Snf7 de *S. cerevisiae*. En esta tabla se incluye únicamente el resultado arrojado cuando se las compara con CHMP4B (NP_789782) de *H. sapiens*. La comparación con el listado completo de organismos se encuentra en el **Apéndice I Tabla 1**

2.4 Estructura secundaria de la secuencia candidata TbVps32

Como se determinó anteriormente, la estructura secundaria es una característica particular de las proteínas del subcomplejo ESCRT-III y, particularmente de Vps32, ya que a través de la misma puede ejercer los cambios conformacionales descritos (Shim et al., 2007). De esta manera, la secuencia candidata TcVps32 (Tb427_110104600.1) fue evaluada con la herramienta Jpred, obteniéndose una estructura compuesta de cinco hélices α y el *Linker* en el CTR (**FIGURA 5**). Paralelamente, se calcularon los puntos isoeléctricos (pI) de cada hélice α (Shim et al., 2007).

Tal como en TcVps32, la primera hélice α de TbVps32 presentó un pI más próximo a 7 que básico (6.84). Asimismo, a esta hélice, tal como en TcVps32, le sucedió una hélice α básica de pI aproximado a 9 (**FIGURA 1 y 5**). Respecto al CTR, las tres hélices α CTR presentaron características ácidas al igual que las del par alélico TcVps32 y las estructuras reportadas de CHMP4 y Snf7 (Shim et al., 2007).



FIGURA 5. Estructura secundaria de la secuencia candidata TbVps32 de *T. brucei*. A través del análisis de la secuencia Tb427_110104600.1, secuencia candidata TbVps32, mediante la herramienta Jpred, se detectaron cinco hélices α , cada una con un determinado punto isoeléctrico (pI). La NTR presenta la primera hélice α con un pI neutro (violeta) seguida de una hélice α básica (azul), tal como sido observado en la proteína Vps32 de *T. cruzi* (TcVps32). Asimismo, la CTR se encuentra compuesta

por tres hélices α de características ácidas (rojo) tal como se ha reportado en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. Entre la hélice $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se reconoce la región *Linker* (verde) característica de Vps32.

2.5 Detección del motivo MIM de TbVps32.

Con la finalidad de detectar el motivo MIM (*MIT- Interacting Motif*) ubicado en CTR presente en las proteínas miembros de ESCRT-III, se realizó el alineamiento global y múltiple entre la secuencia candidata a TbVps32 (Tb427_110104600.1) y las secuencias proteicas cuyos motivos MIM se encuentran conservados: Vps2, Did2, CHMP1a, CHMP1b y CHMP2a. La secuencia consenso (D/E) xxLxxRLxxL(K/R), está compuesta por seis aminoácidos conservados y para el análisis de este motivo, los autores asignaron a cada aminoácido un número de orden respecto a una posición central (orden 0) correspondiente al residuo arginina (R). De esta manera se generó el ordenamiento de posiciones -2, -1, 0, +1, +2 y +3 para cada aminoácido conservado, siendo R la posición central (**FIGURA 6**).

A través del alineamiento de las secuencias se pudo determinar que en la posición 0 (cero) de Vps2 y Did2 se encuentra el aminoácido arginina, mientras que en la secuencia candidata TbVps32 esta posición está ocupada por un residuo alanina (A). Esto también se observa en las secuencias TcVps32 de *T. cruzi*, Snf7 de *S. cerevisiae* y en la isoforma CHMP4A de *H. sapiens*.

Si bien a medida que los aminoácidos se alejan de la posición 0 (cero) van perdiendo grado de conservación, en la secuencia candidata TbVps32 se mantiene el residuo leucina (L) en las posiciones +1 y +2 del motivo. Esto mismo se observa en las secuencias TcVps32 de *T. cruzi*, la isoforma CHMP4A de *H. sapiens* y Snf7 de levaduras.

Hecho contrario se observa en las posiciones -1 y -2 de la secuencia TbVps32, posiciones en las cuales se observa divergencia respecto a las proteínas Vps2, Did2, CHMP1a/b y CHMP2a (proteínas con MIM conservado). Sin embargo, en la posición -1, se observa un residuo de ácido glutámico (E), al igual que en CHMP4B; y en la posición -2 un aminoácido valina (V) al igual que en CHMP4A.

A

			-2	-1	0+1	+2+3	
			218		224	229	
Sc	Vps2	.NP	DDD	L	QARLNT	LKKQT	232
Sc	Did2	.EK	EDKLA	QRLRAL	RG		204
Hs	CHMP1A	.SQ	EDQL	SRRLA	ALRN		196
Hs	CHMP1B	.AE	QDELS	QRLARL	RDQV		199
Hs	CHMP2A	.DA	DADL	EEERL	KNLRRD		222
Hs	CHMP2B	.IS	DEEIER	QLKAL	GVD		213
Hs	Vps24	.EA	LEAMQS	RLATLR	S		222
Sc	Vps24	.RM	VNEMR	ERLRAL	QN		224
Sc	Snf7	.DE	EDEDEK	ALREL	QAEMGL		240
Hs	CHMP4A	.PK	VDEDEE	EALKQL	AEWVS		222
Hs	CHMP4B	.KK	KEEEDDD	MKELEN	WAGSM		224
Hs	CHMP4C	.QR	AEEEDDD	IKQLAA	WAT		233
Hs	CHMP5	.DT	KNKDG	VLVDEF	GLPQIPAS		219
Sc	Vps60	.EP	NLDTE	DKNKA	LESAQ		229
Sc	Vps20	.EE	RSDTK	EPLALL	S		221
Hs	Vps20	.VK	ARPRQ	AELVAAS			201

B

		-2	-1	0	+1	+2	+3														
		▼	▼	▼	▼	▼	▼														
DID2		E	K	D	K	L	A	QRLRALRG*----- 204													
CHMP1a		S	Q	E	D	Q	L	SRRRLAALRN----- 196													
CHMP1b		A	E	Q	D	E	L	SQRLARLRDQV----- 199													
Vps2		N	P	D	D	D	L	QARLNTLKKQT----- 232													
CHMP2a		D	A	D	A	D	L	EEERLKNLRRD----- 222													
Esmeraldo TcVps32		---	D	E	D	E	E	A	L	R	A	L	E	A	E	L	Q	S	---	227	
Non Esmeraldo TcVps32		---	D	E	D	E	E	A	L	R	A	L	E	A	E	L	Q	S	---	227	
TbVps32		---	D	E	E	E	E	A	L	R	A	L	E	R	E	L	L	S	---	228	
Snf7			D	E	E	D	E	D	E	K	A	L	R	E	L	Q	A	E	M	G	L 240
CHMP4A		---	E	D	E	E	A	L	K	Q	L	A	E	W	V	S	---	222			
CHMP4B		---	E	E	D	D	M	K	E	L	N	W	A	G	S	M	--	224			

FIGURA 6. Motivo MIM. A. Por encima de la línea negra, se encuentran las secuencias proteicas correspondientes a las proteínas ESCRT-III cuyos motivos MIM, (D/E) xxLxxRLxxL(K/R), se encuentran conservados. Por debajo de la línea, se detallan las proteínas cuyos motivos MIM divergen respecto a las proteínas con MIMs conservados. En la posición 0 (cero) o posición central se ubica el aminoácido

arginina (R) y desde ahí se organizan los restantes aminoácidos conservados. **B.** Búsqueda del motivo MIM en las secuencias candidatas TbVps32 (Tb427_110104600.1). Arginina(R), leucina (L), alanina (A), ácido glutámico (E), valina (V), aspartato (D).

Por último, en la posición +3 del motivo, la secuencia candidata TbVps32 presenta un aminoácido de ácido glutámico (E) a diferencia del conservado aminoácido de arginina que se encuentra en Did2, CHMP1a/b, Vps2 y CHMP2A. Sin embargo, el aminoácido E también se observa en la misma posición de la isoforma CHMP4B y en las secuencias del par alélico TcVps32.

De esta manera, a través de este análisis pudimos confirmar la presencia del motivo MIM en la secuencia TbVps32, el cual exhibe los aminoácidos leucina conservados en las posiciones +1 y +2. Adicionalmente, en las posiciones -2,-1, 0 y +3, se ubican residuos coincidentes con los presentes en proteínas con motivos MIM descritos como “divergentes” (Snf7 y las isoformas CHMP4A y CHMP4B). Por último, cabe destacar la presencia de aminoácidos idénticos a los presentes en el par TcVps32 de *T. cruzi* en las posiciones 0, +1, +2 y +3.

2.6 Análisis de identidad y similitud entre la secuencia candidata TbVps32 y proteínas ESCRT-III.

A pesar de que la secuencia candidata TbVps32 exhibe aminoácidos idénticos en las mismas posiciones observadas en Snf7 y CHMP4, se realizó el alineamiento de a pares y global entre la secuencia TbVps32 y cada una de las secuencias miembros de ESCRT-III de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*, las cuales presentan el motivo MIM (**TABLA 13**). En el análisis no se consideró la proteína Vps24/CHMP3. ya que la misma exhibe valores de identidad/similitud no significativos cuando se la compara con Vps32/CHMP4 (**Apéndice I TABLA 3**).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
ID/Similitud (%)*	Snf7	Vps60	Vps20
Tb427_110104600.1 (TbVps32)	28,3/52,2	20,8/42,9	24,4/42

<i>Homo sapiens</i>					
ID/Similitud (%)*	CHMP4A	CHMP4B	CHMP4C	CHMP5	CHMP6
Tb427_110104600.1 (TbVps32)	33,9/50	31,5/50	29,3/43,4	25,4/45,1	22/39,8

TABLA 13. Análisis de identidad/ similitud de la secuencia candidata TbVps32 y otras proteínas miembros de ESCRT-III mediante ClustalW. En la tabla superior, la secuencia TbVps32 es comparada con su ortólogo Snf7 y otros miembros ESCRT-III de *S. cerevisiae*. En la tabla inferior, la comparación de la secuencia TbVps32 se realiza con su ortólogo CHMP4 (isoformas a, B y C) y otros miembros ESCRT-III de *H. sapiens*.

La secuencia candidata TbVps32 (Tb427_110104600.1) presenta homología significativa con la secuencia CHMP4A (isoforma de la proteína CHMP4 de *H. sapiens*) (33,9% de identidad y 50% de similitud), teniendo en cuenta que la identidad y similitud entre CHMP4A y Snf7 es de 38% y 55%, respectivamente.

Cuando se compara la secuencia candidata TbVps32 con CHMP6, entre ambas secuencias se exhibe 22% de identidad y 39,8% de similitud, valor similar a cuando se compara CHMP4B con CHMP6 (22,9% de identidad y 47% de similitud) y CHMP4A con CHMP6 (26% de identidad y 51.1% de similitud). Lo mismo ocurre cuando se observan los valores de identidad/similitud entre la secuencia TbVps32 y CHMP5 y se compara el mismo con los valores de identidad/similitud entre CHMP5 y las isoformas de CHMP4 (**TABLA 3 Apéndice I**). Además, puede observarse que la secuencia candidata TbVps32, presenta mayor homología con CHMP5 que con CHMP6, con lo cual se repite el patrón observado cuando se comparan CHMP4A/B y CHMP5 de *H. sapiens* (**Apéndice I TABLA 3**).

Se observa mayor homología entre Snf7 y Vps20 (27,1% de identidad y 45,5% de similitud) que con Vps60 (obtiene 26,3% de identidad y 45,2% de similitud), hecho que se repite al observar los valores obtenidos cuando se compara la secuencia candidata TbVps32 (Tb427_110104600.1) con Vps20 (24,4/42%) y con Vps60 (20,8/42,9%).

En suma, la secuencia anotada como Tb427_110104600.1 presenta significativa homología de secuencia no sólo con Snf7/Vps32 de *S. cerevisiae* y CHMP4 de *H. sapiens*, sino con otras secuencias proteicas pertenecientes a miembros de ESCRT-III. Por este motivo, dicha secuencia será nombrada, de aquí en adelante, como TbVps32 de *T. brucei*.

2.7 Amplificación de los genes y confirmación de la identidad

Para llevar a cabo el diseño de oligonucleótidos para TbVps32 utilizamos la herramienta TripanoFAN (<http://trypanofan.bioc.cam.ac.uk/cgi-bin/rnait.cgi>). De esta manera, la secuencia TbVps32 (Tb427_110104600.1) fue utilizada como template e insertada en el programa, a partir del cual se obtuvo un par de oligonucleótidos (Forward y Reverse). La especificidad de estos se evaluó generando el alineamiento de las secuencias TbVps32 y Tb427tmp.0.01.1390 e identificando las regiones de anclaje de los *primers* según TripanoFAN. Esta estrategia permitió confirmar la ausencia de variaciones de secuencia en dichas regiones, asegurando así la capacidad para amplificar específicamente la secuencia de interés.

Una vez obtenido el par de primers específicos a partir del DNA genómico de la cepa *T. brucei* *Lister 427*, se obtuvo un único producto de amplificación por PCR de 477 pb, el cual posteriormente fue subclonado en el vector pGEM-T Easy (**FIGURA 7**).

Paralelamente, para la estrategia de sobreexpresión inducible de la proteína TbVps32, se realizaron los *primers* correspondientes utilizando como template la secuencia TbVps32 elegida mediante el análisis bioinformático, Tb427_110104600.1. Debido a que la estrategia consta de la expresión inducible de TbVps32 con la etiqueta de hemaglutinina (HA) en el extremo N-terminal, la secuencia genómica que codifica para HA fue añadida al primer *Forward*. Posteriormente, a partir del ADN genómico de la cepa *T. brucei* *Lister 427* se amplificó el gen TbVps32 por PCR. El único fragmento obtenido de 711 pb fue clonado en el vector pGEM-T Easy y, posteriormente, los distintos clones obtenidos fueron secuenciados para obtener una secuencia consenso del gen. La secuencia obtenida para TbVps32 fue alineada con la secuencia Tb427_110104600.1 mediante ClustalW y de esta manera se pudo corroborar lo hallado en la base de datos del genoma de *T. brucei*. Entre ambas secuencias proteicas se halló 100% de identidad y 100% de similitud.

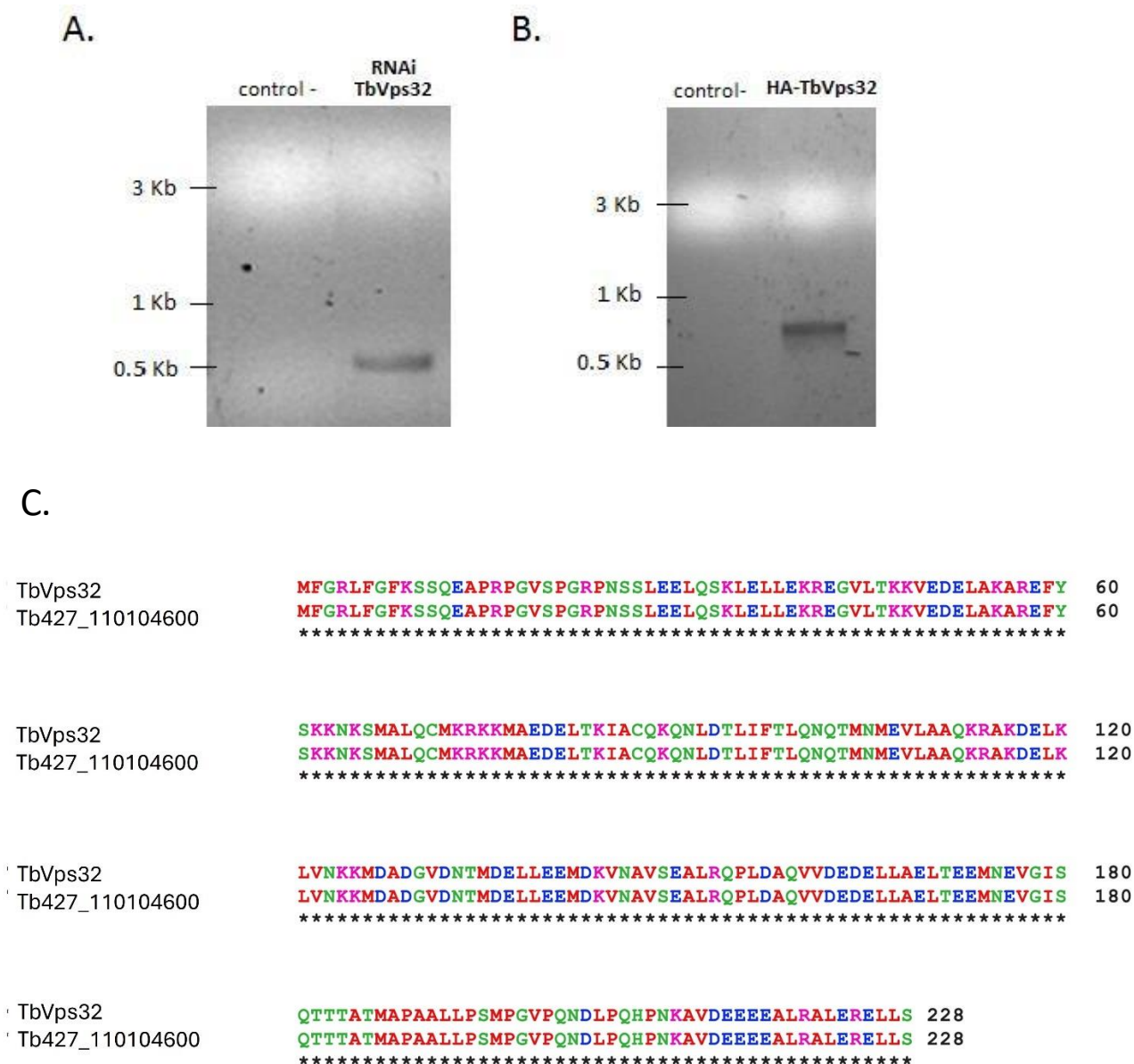


FIGURA 7. Amplificación del gen TbVps32. **A.** Producto de amplificación de TbVps32 por PCR con los *primers* específicos para la estrategia de silenciamiento génico de TbVps32 mediante RNAi. **B.** Producto de amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos para la estrategia de sobreexpresión de TbVps32 con etiqueta de hemaglutinina (HA) en el extremo N-terminal. **C.** La secuencia proteica del gen TbVps32 obtenido por amplificación fue comparada por alineamiento con la secuencia utilizada como templado, Tb427_110104600.1. Este alineamiento demostró una homología completa entre secuencias (100 % de identidad y 100 de similitud%).

3. MOTIVOS de TcVps32 y TbVps32

MIMs (CTR)

La proteína Vps4, perteneciente a la familia de proteínas AAA-type *ATPases* presenta un

dominio de unión al sustrato en el NTR denominado *Microtubule Interacting and Transport* (MIT) (Lupas & Martin, 2002; Obita et al., 2007). Tanto el reclutamiento de Vps4 y la consiguiente reacción de desensamblaje del ESCRT requieren la interacción del dominio Vps4 MIT con dos dominios específicos denominados *MIT- Interacting motifs* o *MIMs*. Se conocen dos dominios MIM en las subunidades ESCRT-III: MIM1-*like* y MIM-2. Ambos interactúan con regiones diferentes del dominio MIT de Vps4, posibilitando la ocurrencia simultánea de ambas interacciones. De hecho, ambos tipos de motivos MIM son requeridos para la adecuada actividad de Vps4 durante el reciclaje de las subunidades ESCRT-III y la formación de vesículas MVB (Shestakova et al., 2010). Se ha reportado que las interacciones establecidas entre los dominios MIT de Vps4 y MIMs son débiles con valores de *Kd* en el rango micromolar (μM), sugiriendo que ocurren varias interacciones de manera sinérgica y simultánea para lograr el reclutamiento de Vps4. Sin embargo, pese a la baja afinidad reportada de las interacciones MIT-MIMs, se ha descrito que MIM-1 presenta una afinidad alta y significativa por Vps4 respecto a la afinidad que presenta MIM-2 por la misma (Kieffer et al., 2008; Stuchell-Brereton et al., 2007). Esto expone las diferencias funcionales entre distintos miembros de un mismo subcomplejo ya que, si bien todas las proteínas de ESCRT-III presentan ambos MIMs, el motivo MIM-1 se encuentra principalmente en el CTR de Vps2 y Vps24, mientras que el motivo MIM-2 se encuentra principalmente en el CTR de Vps20 y Snf7/Vps32 (Kieffer et al., 2008; Obita et al., 2007; Shim et al., 2008; Stuchell-Brereton et al., 2007).

3.1 MIM-1

Tanto en levaduras como en humanos algunas proteínas de la familia ESCRT-III y *ESCRT-III like* presentan el motivo MIM1-*like* compuesto por una secuencia de seis aminoácidos conservados dispuestos en la última hélice α del CTR (Obita et al., 2007; Shestakova et al., 2010). El motivo MIM fue reconocido en esta región, tanto en TcVps32 de *T. cruzi* y TbVps32 de *T. brucei* tal como se muestra en **FIGURA 2** y **FIGURA 6**. A diferencia de lo que ocurre con otras subunidades del subcomplejo ESCRT-III, las cuales a través de este dominio interactúan directamente con Vps4, el dominio MIM-1-*like* en Vps32 funciona como “*target*” de la proteína conocida como Bro1 en levaduras y Alix en humanos, miembro del subcomplejo ESCRT-II

(Shestakova et al., 2010). Por lo tanto, la detección del motivo MIM-1-*like* en TcVps32 y TbVps32, indicaría la posibilidad de que su reclutamiento a la membrana se encuentre nucleado por proteínas miembros del subcomplejo ESCRT-II.

3.2 MIM-2: generalidades

El motivo MIM-2, *target* de la ATPasa Vps4, en un principio fue descrito por presentar la secuencia consenso LP(E/D) VP y posteriormente, varios autores postularon que constaba de una secuencia general descrita como $\Phi_1P_1X\Phi_2P_2$, donde P corresponde a prolina, Φ representa un aminoácido hidrofóbico y X un aminoácido polar (Craik, 2008; Vild & Xu, 2014). Años más tarde, se determinó una secuencia MIM-2 más precisa, conocida como “ $\Phi_1P_1X\Phi_2P_2xxP_3\Phi_3P_4$ ”, que surgió del análisis estructural de varias proteínas miembros de ESCRT-III y su interacción con el dominio MIT de Vps4 (**FIGURA 3.1.1A**). Hasta el momento, esta secuencia ha sido postulada como la más probable o la que mejor refleja la complejidad de las interacciones entre proteínas mediante este motivo (Kojima et al., 2016).

La secuencia del motivo MIM-2 fue analizada en proteínas miembros de ESCRT-III tanto en *S. cerevisiae* como en *H. sapiens*. En el caso de Vps32, este dominio fue ubicado en la región *Linker* CTR (Shen et al., 2014; Tang et al., 2015).

En Snf7 de *S. cerevisiae*, se observó que la primera prolina del motivo ocupa la posición 200 (P200) de la secuencia y está precedida por un aminoácido hidrófobo leucina (L) (**FIGURA 8**).

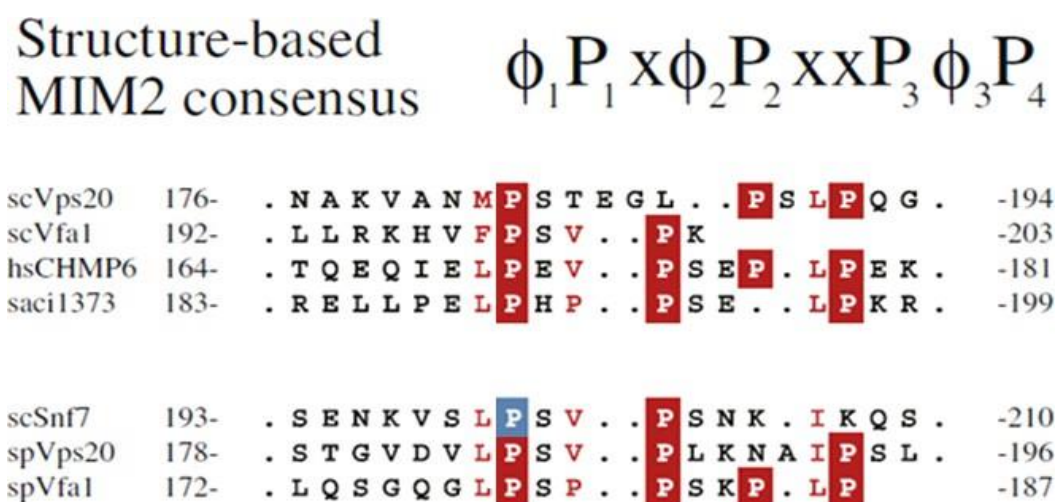


FIGURA 8. Ubicación del dominio MIM-2 de Vps32 de distintos organismos. Al realizar el

alineamiento de secuencia de varias subunidades de ESCRT-III de diferentes especies se encontró el motivo MIM-2 (*MIT- Interacting Motif*) ubicado en la región *Linker* CTR que une la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 6$. La secuencia está compuesta por cuatro residuos de Prolina (P), generalmente precedidos por aminoácidos hidrófobos. La P200 se encuentra coloreada en azul. Los residuos conservados se visualizan en rojo (Kojima et al., 2016).

El análisis focalizado de la proteína Vps32 conllevó al alineamiento múltiple de las secuencias Vps32 de *C. elegans*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens* y *A. thaliana*, a través del cual se determinó que MIM-2 comienza con un aminoácido prolina (P) en estos organismos. Por el contrario, a través de este alineamiento se determinó que en *S. cerevisiae* comienza con un aminoácido serina (S). Por lo tanto, según el mismo, el residuo de prolina en la posición 200 (P200) en realidad constituía la segunda posición del motivo (**FIGURA 9**). Tanto la segunda P como la primera (ausente en Snf7) se encontró antecedita por aminoácidos hidrófobos como leucina (L) y valina (V) (**FIGURA 9**), con lo cual se consideró que el dominio MIM-2 de Snf7 respeta un patrón similar al de la secuencia MIM-2 descrita para varios miembros de ESCRT-III, conocida como “ $\Phi 1P1x\Phi 2P2xxP3\Phi 3P4$ ”.

MIM-2 de TbVps32 de *Trypanosoma brucei* y TcVps32 de *Trypanosoma cruzi*.

Con el objetivo de hallar el motivo MIM-2 en las proteínas Vps32 de *T. brucei* y *T. cruzi*, se llevó a cabo el alineamiento global y múltiple de estas secuencias mediante Clustal Omega, incluyendo a la secuencia proteica Snf7 de levaduras y las tres isoformas de CHMP4 de *Homo sapiens* (CHMP4A, CHMP4B y CHMP4C) (**FIGURA 10**). En este análisis, el residuo P200 de Snf7 fue utilizado como referencia para la detección de MIM-2. De esta manera, pudimos hallar un motivo MIM-2 ubicado en la región *Linker* CTR, el cual une la hélice $\alpha 4$ con la hélice $\alpha 5$ de TcVps32 y TbVps32. Asimismo, la secuencia MIM-2 hallada presentó los aminoácidos de prolina descriptos, anteceditos por residuos hidrofóbicos: leucina (L), isoleucina (I) y metionina (M) (**FIGURA 10**).

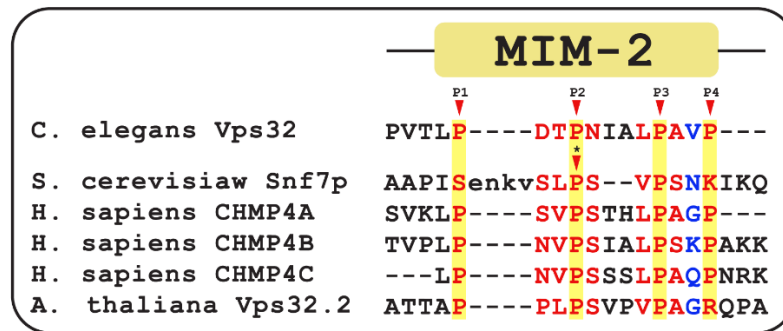
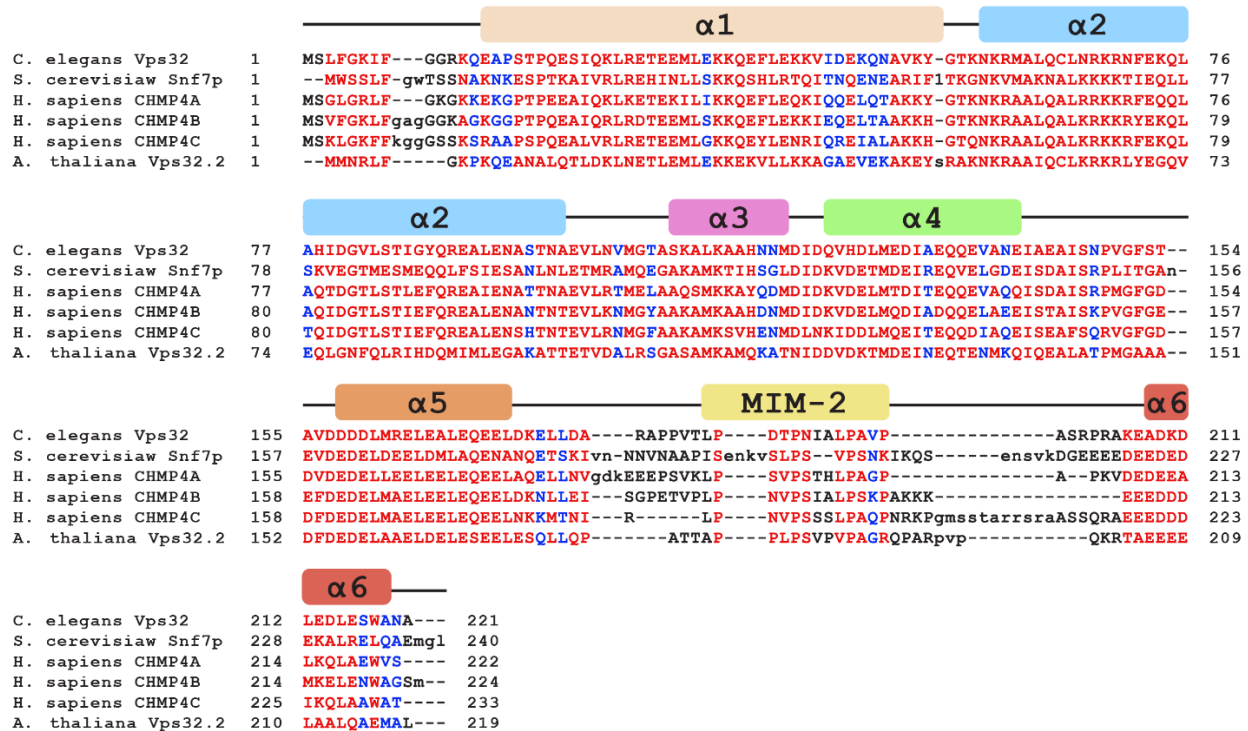


FIGURA 9. Secuencia consenso de motivo MIM-2. Se muestra el alineamiento de aminoácidos de la región MIM-2. El dominio MIM-2 generalmente presenta en su secuencia cuatro aminoácidos de prolina (P1, P2, P3 y P4) anteceditos por aminoácidos hidrófobos: leucina(L) y valina (V). Este dominio había sido encontrado en la secuencia de Snf7/Vps32, en el cual se remarcó el residuo de prolina (P) de la posición 200 como primer residuo de la secuencia (asterisco).

TbVps32

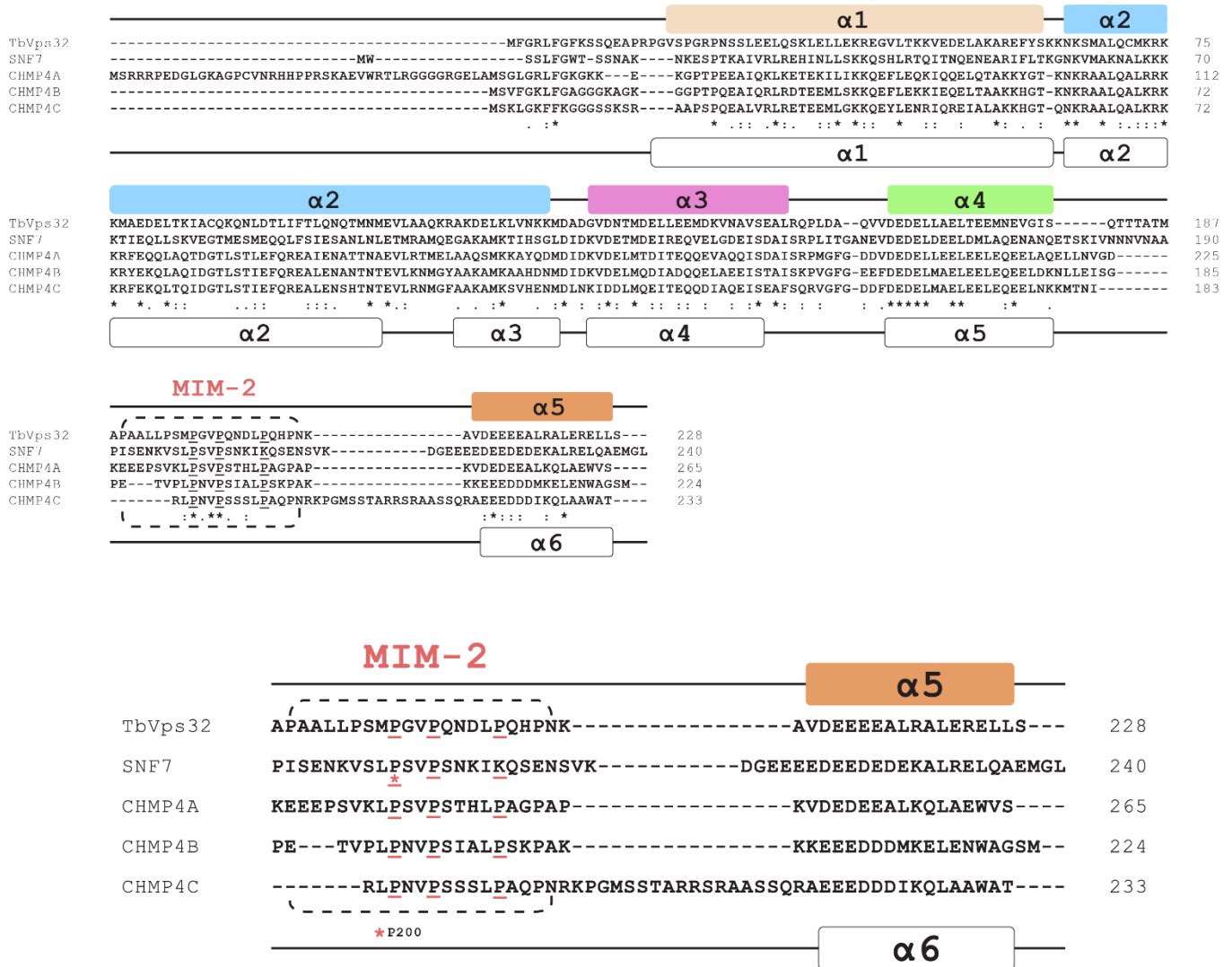


FIGURA 10. Búsqueda de secuencia MIM-2 en TbVps32 y TcVps32. Alineamiento global y múltiple de las secuencias proteicas de Vps32 de *S. cerevisiae* (snf7), *H. sapiens* (CHMP4A-C) y *T. brucei* (TbVps32) por un lado y *T. cruzi* (TcVps32) por el otro, mediante Clustal Omega. MIM-2 fue encontrado en la región *Linker* CTR. La P en la posición 200 (P200) de la secuencia Snf7 fue utilizada como referencia (asterisco) para marcar los aminoácidos P restantes en las secuencias de TbVps32, TcVps32 y CHMP4A-C. Por encima se observa el *Linker* CTR y la hélice α5 de TbVps32 o TcVps32 y por debajo, estructura secundaria de las secuencias Snf7 y CHMP4.

TcVps32

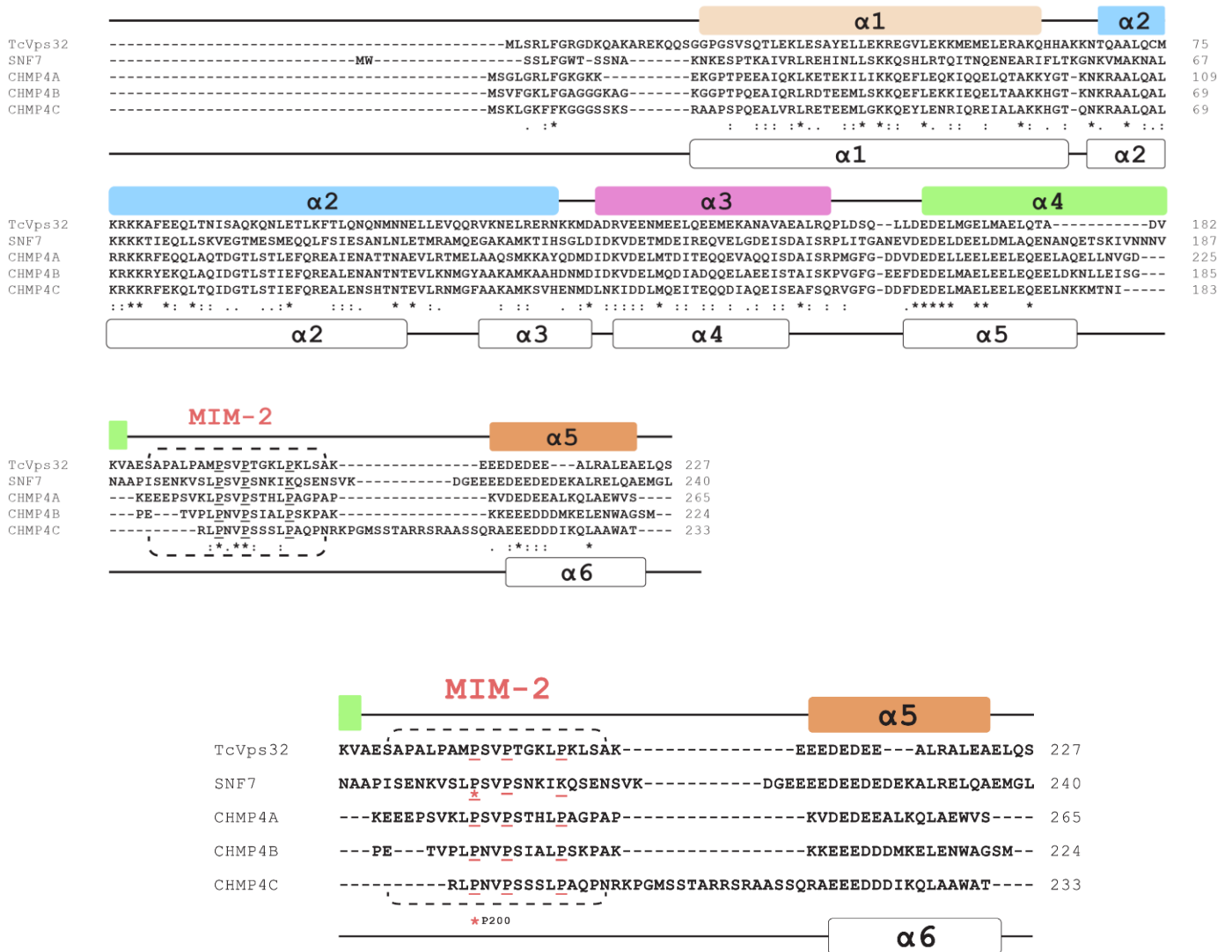


FIGURA 10. Búsqueda de secuencia MIM-2 en TbVps32 y TcVps32. Alineamiento global y múltiple de las secuencias proteicas de Vps32 de *S. cerevisiae* (snf7), *H. sapiens* (CHMP4A-C) y *T. brucei* (TbVps32) por un lado y *T. cruzi* (TcVps32) por el otro, mediante Clustal Omega. MIM-2 fue encontrado en la región *Linker* CTR. La P en la posición 200 (P200) de la secuencia Snf7 fue utilizada como referencia (asterisco) para marcar los aminoácidos P restantes en las secuencias de TbVps32, TcVps32 y CHMP4A-C. Por encima se observa el *Linker* CTR y la hélice α5 de TbVps32 o TcVps32 y por debajo, estructura secundaria de las secuencias Snf7 y CHMP4.

Con el objetivo de evaluar la secuencia minuciosamente, procedimos a enumerar cada residuo prolina con un número de posición de izquierda a derecha (**FIGURA 11**) nuevamente tomando como referencia al residuo P200 de la secuencia Snf7 (Kojima et al., 2016). De esta manera,

cuando se analizó la secuencia TbVps32 de *T. brucei*, se pudo observar que el aminoácido que antecede a P1 corresponde a un residuo de metionina (M), mientras que en Snf7 y CHMP4 se observó un residuo de leucina (L). El aminoácido que antecede a P2, corresponde a valina (V) (se encuentra en todas las secuencias); y el aminoácido que antecede a P3 corresponde a un residuo de leucina (L) tanto en TbVps32 como en las secuencias CHMP4A-C. Respecto a P4, las secuencias analizadas se encuentran precedidas por aminoácidos polares (serina en Snf7, glicina en CHMP4A, glutamina en CHMP4C e histidina en TbVps32). Este análisis, nos permitió determinar que TbVps32 presenta un motivo MIM-2 compuesto por los clásicos aminoácidos prolina (P). En las primeras posiciones, P1 y P2 se observó coincidencia de aminoácidos con Snf7 y CHMP4A-C (**FIGURA 11**) y los aminoácidos que anteceden estas ubicaciones son hidrófobos. El aminoácido valina, anterior a P2, se encuentra conservado. Asimismo, el motivo MIM-2 parecería extenderse hasta una tercera y cuarta posición de prolina (P3 y P4) tal como se observa en CHMP4A-C y TbVps32.

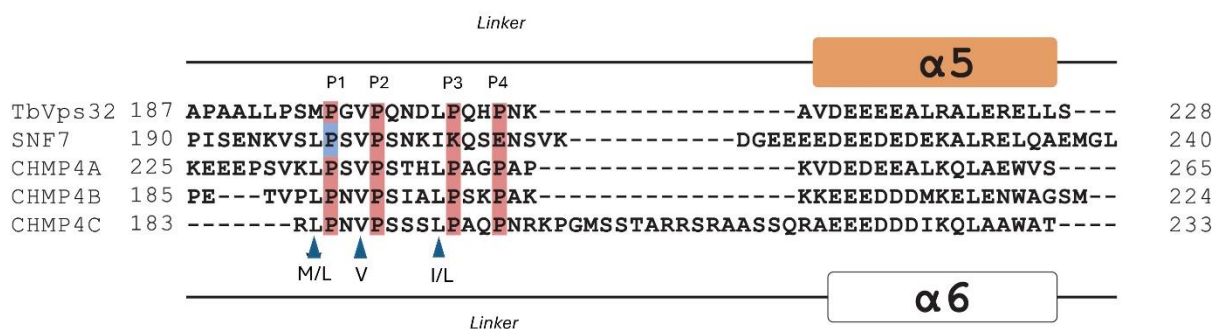


FIGURA 11. Motivo MIM-2 de TbVps32 de *T. brucei*. Las secuencias Snf7 y CHMP4A-C fueron incluidas en el alineamiento con TbVps32 con el fin de hallar el motivo MIM-2, el cual se ubica en la región *Linker* CTR. Por encima de las secuencias alineadas se puede observar la región *Linker* CTR y hélice α5 de TbVps32 mientras que por debajo de puede observar la región *Linker* CTR y la hélice α6 que conforman la estructura secundaria de Snf7 y CHMP4A-C. En el alineamiento, las flechas rojas indican los residuos de prolina (P) numerados de izquierda a derecha y en verde se indican los aminoácidos hidrófobos. En la secuencia de Snf7, el residuo de prolina (P) en la posición 200 se corresponde con P1. Metionina (M), Leucina (L), Valina (V), Isoleucina (I), Lisina (K), Serina (S), Glicina (G), Glutamina (Q).

Al analizar la secuencia TcVps32 de *T. cruzi*, P1 se encontró antecedido por un aminoácido metionina (M) mientras que en Snf7 y CHMP4A-C, se observó un aminoácido leucina (L) (**FIGURA 12**). En todas las secuencias, el aminoácido que antecedió a P2 fue un residuo de valina (V). La tercera posición o P3 fue ocupada por prolina en las secuencias TcVps32 y en las

secuencias CHMP4A-C; sin embargo, en esta posición se encontró lisina (K) en Snf7. El aminoácido L antecede inmediatamente a P3 de TcVps32 y de las secuencias CHMP4A-C; mientras que en Snf7, un residuo isoleucina (I) antecede al residuo K que ocupa la P3. En la posición P4, sólo las secuencias CHMP4A-C presentaron el aminoácido P y estuvieron precedidas por aminoácidos no hidrófobos.

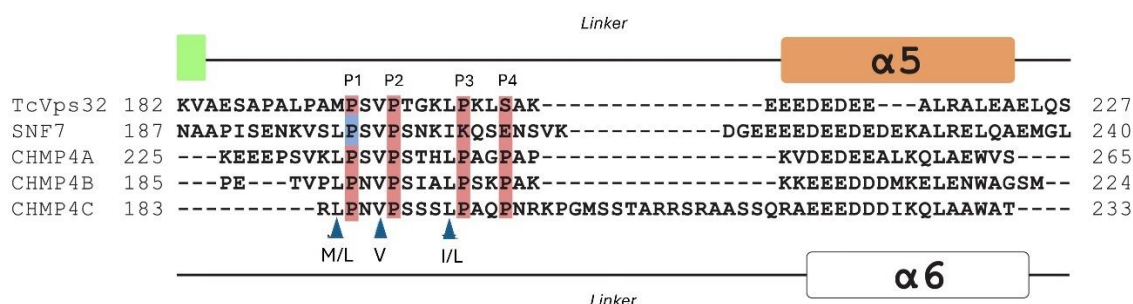


FIGURA 12. Motivo MIM-2 de TcVps32 de *T. cruzi*. Las secuencias Snf7 y CHMP4A-C fueron incluidas en el alineamiento con TcVps32 con el fin de hallar el motivo MIM-2, el cual se ve ubicado en la región *Linker* CTR. Las flechas rojas indican los residuos de Pro (P) numerados de izquierda a derecha y las flechas verdes indican los aminoácidos hidrófobos que los preceden. En la secuencia de Snf7, el residuo de prolina (P) en la posición 200 se encuentra coloreado en celeste. Por encima del alineamiento de secuencias se puede observar la región *Linker* CTR y la hélice α5 de TcVps32 mientras que, por debajo del alineamiento, se puede observar la región *Linker* CTR y la hélice α6 que conforman la estructura secundaria de Snf7 y CHMP4A-C. Metionina (M), Leucina (L), Valina (V), Isoleucina (I), Lisina (K), Serina (S), Glicina (G), Glutamina (Q).

El motivo MIM-2 de TcVps32y TbVps32 presentan prolina en las posiciones P1 y P2, lo cual coincide con lo hallado en Snf7 y CHMP4A-C. En TcVps32 y TbVps32, P1 se encuentra antecedido por el aminoácido metionina (M) y, asimismo, nuevamente se observa la conservación del aminoácido valina (V) que antecede a P2. En TcVps32, TbVps32 y CHMP4A-C, la tercera posición está ocupada por P. Sin embargo, en esta posición, Snf7 presenta un aminoácido lisina (K). Respecto a P4, en las secuencias de TbVps32 y CHMP4A-C se encuentra ocupado por P, mientras que TcVps32 se encuentra ocupado por un residuo de serina (S).

En suma, a través de este análisis, detectamos el motivo altamente conservado MIM-2 en

ambos tripanosomátidos, cuya secuencia presenta los característicos aminoácidos P. Parecerían conservarse los residuos de las posiciones P1 y P2, al igual que el residuo V que antecede a P2. A partir de las posiciones P3 y P4, comienza a hacerse evidente la divergencia de los aminoácidos. Por lo tanto, podría considerarse que el motivo MIM-2 se extiende hasta P3, ya que en todas las isoformas de CHMP4 también se evidencia un aminoácido P en esta ubicación. Por lo tanto, TbVps32 presenta un motivo MIM-2 ubicado entre los aminoácidos Met196 y Pro205 ubicado en el *Linker* CTR y que presenta residuos conservados de P. Asimismo, TcVps32 presenta un motivo MIM-2 ubicado aproximadamente, entre los aminoácidos 194 y 203 ubicado en el *Linker* CTR, también exhibiendo los residuos conservados de P.

3.3 Elemento INS: generalidades

La proteína Vps32 conocida como CHMP4 en *H. sapiens* presenta tres isoformas: CHMP4A, CHMP4B y CHMP4C. Si bien todas las isoformas participan en diversas funciones celulares tales como la formación de MVB, la exocitosis y la brotación de partículas virales, la isoforma CHMP4B ha sido descrita como la principal efectora en la abscisión de las membranas y la isoforma CHMP4C ha sido descrita como partícipe del punto de control o *checkpoint* de la citoquinesis (Capalbo et al., 2016) (**Introducción, 5.6.2 Regulación de la citoquinesis celular**). En este punto de control "*NoCut*" de la citoquinesis, la Aurora quinasa B ejerce una regulación temporo-espacial sobre la proteína CHMP4C (Mendoza et al., 2009; Norden et al., 2006; Steigemann et al., 2009). De esta manera, cuando ambas se encuentran) próximas entre sí, en el cuerpo medio celular (*midbody*), la Aurora quinasa B fosforila residuos de Ser específicos ubicados en la región *Linker* CTR de CHMP4C. Esto produce su inactivación la consecuentemente inhibición de la abscisión. Esta acción específica de la Aurora quinasa B sobre CHMP4C fue analizada a fin de comprender el comportamiento diferencial de los parálogos CHMP4. De esta manera, se realizó el alineamiento de las secuencias de cada una de las isoformas y a través del análisis, se detectó una inserción específica ubicada en la región *Linker*. La misma se extendió desde el residuo 201 al 217 de la isoforma CHMP4C. Este elemento únicamente presente en CHMP4C, fue denominado INS (Carlton et al., 2012a) (**FIGURA 13**). Posteriormente, este análisis se extendió a la proteína Vps32 de *Drosophila*

melanogaster, denominada Shrb, en la cual tampoco se detectó este elemento (Capalbo et al., 2012).

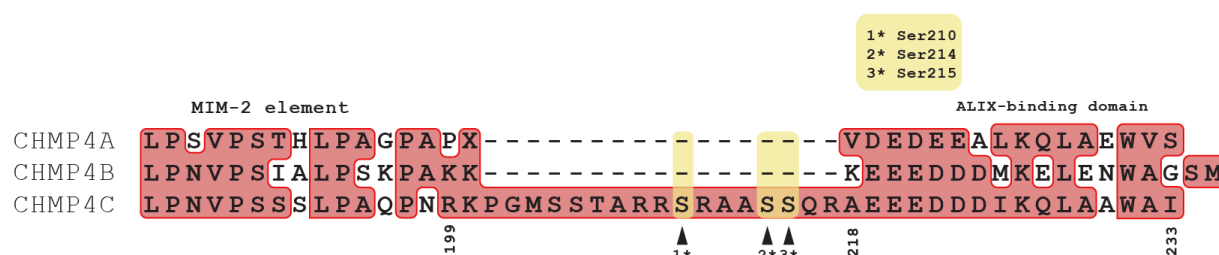


FIGURA 13. Alineamiento de las regiones C-terminales de CHMP4A, CHMP4B y CHMP4C mediante Clustal W. La inserción INS sólo se encontró en la isoforma CHMP4C. INS consta de 16 aminoácidos con la secuencia “PGMSSTARRSRAASSQ”. Los residuos de serina en la posición 210 (S210), 214 (S214) y 215 (S215) se encuentran indicados con una flecha y numerados. También se muestran los motivos MIM que interactúan con MIT de Vps4: MIM-2 y MIM-1-like (*ALIX-binding domain*). Esquema modificado de Carlton et al., 2012. Prolina (P), Glicina (G), Metionina (M), Serina (S), Treonina (T), Alanina (A), Arginina (R), Glutamina (Q).

El elemento INS fue descrito como una plataforma “*target*” de la Aurora quinasa B, compuesto por numerosos residuos de serina (S) y treonina (T) susceptibles a la fosforilación por parte de esta quinasa. Fueron destacados tres residuos blanco de fosforilación por la quinasa dentro de la secuencia INS: serina 210 (S210), serina (S214) y serina (S215), de los cuales, en un inicio, se destacó únicamente al residuo S210 por el alto score obtenido en el análisis *in silico* realizado con el software GPS 2.1 (Capalbo et al., 2012; Carlton et al., 2012) (**FIGURA 13 y TABLA 14**). Sin embargo, la validación *in vitro*, que consistió en la mutación de cada uno de los residuos, resaltó la importancia de la fosforilación de los tres residuos de serina, ya que sólo la introducción de mutaciones en los tres residuos (S214A, S215A y S210A) abolió casi por completo la capacidad de la Aurora quinasa B de fosforilar a CHMP4C (Capalbo et al., 2012, 2016).

position	residue	peptide	GPS 2.1 score	<i>in vitro</i> phosphorylation
136	T	DDLMQEITEQQDIAQ	0.931	nd
146	S	QDIAQEISEAFSQRV	1.621	no
150	S	QEISEAFSQRVGFQD	0.414	no
181	T	EELNKKMTNIRLPNV	2.793	no
190	S	IRLPNVPSSSLPAQP	0.207	no
191	S	RLPNVPSSSLPAQPN	0.483	no
192	S	LPNVPSSSLPAQPNR	2.069	no
204	S	PNRKPGMSSTARRSR	1.724	no
205	S	NRKPGMSSTARRSRA	2.276	no
206	T	RKPGMSSTARRSRAA	0.655	nd
210	S	MSSTARRSRAASSQR	10.379	yes
214	S	ARRSRAASSQRAEEE	2.448	yes
215	S	RRSRAASSQRAEEED	2.655	yes
233	T	KQLAAWAT	0.655	nd

TABLA 14. Resultados de la predicción *in silico* de los posibles sitios de fosforilación de CHMP4C por la Aurora quinasa B y su validación mediante el ensayo de fosforilación *in vitro*. Según los mismos, los residuos de S210, S214 y S215 son blanco de fosforilación por esta quinasa. Serina(S), Treonina (T) (Capalbo et al., 2012).

Con el objetivo de evaluar la presencia de INS en el CTR de las proteínas TbVps32 y TcVps32, se llevó a cabo el alineamiento global y múltiple de estas secuencias y las secuencias proteicas de Snf7 y de las isoformas CHMP4A, CHMP4B y CHMP4C (**FIGURA 14**). En el CTR de CHMP4C se detectó la presencia del característico INS cuya secuencia “PGMSSTARRSRAASSQ” presentó los tres residuos de serina. Tal cual lo descrito para las isoformas CHMP4A y CHMP4B previamente (**FIGURA 13**), tanto en TcVps32 como en TbVps32, no se detectó el elemento INS.

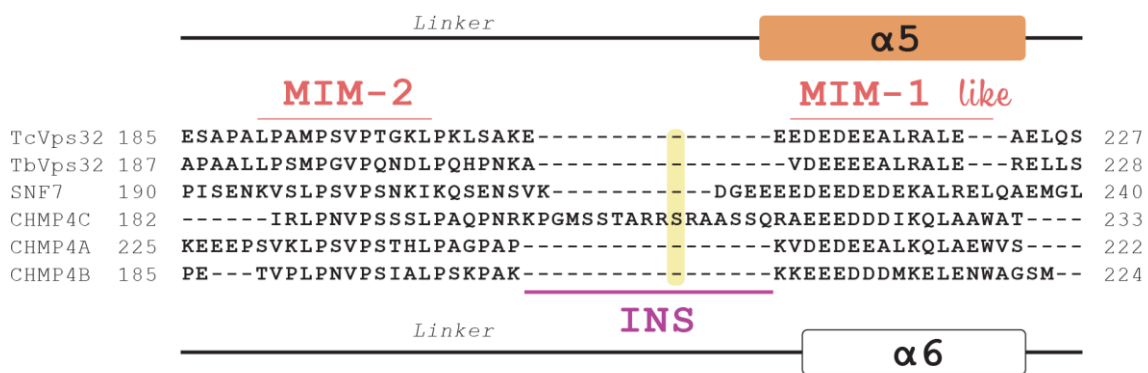


FIGURA 14. Búsqueda de INS en TcVps32 y TbVps32. Alineamiento de secuencias proteicas de CHMP4 (CHMP4A, CHMP4B y CHMP4C), Snf7, TbVps32 y TcVps32 mediante Clustal W. En la secuencia CHMP4C se detecta la inserción INS (subrayado en rosa) en la región *Linker* CTR, con el residuo serina (S) en la posición 210 (S210) (sombreado en amarillo). Se detalla la ubicación del motivo MIM-2 en la región *Linker* y MIM-1-like en la última hélice α CTR. Por encima de los alineamientos se detalla la

región *Linker* y la hélice $\alpha 5$ de TbVps32 o TcVps32 mientras que, por debajo del alineamiento, se detalla la región *Linker* y la hélice $\alpha 6$ que caracterizan a la estructura secundaria de Snf7 y CHMP4A-C.

NTR

3.4 Presencia del motivo ANCHR en *T. cruzi* y *T. brucei*

Muchas proteínas asociadas a la membrana utilizan residuos hidrófobos que sirven para insertarse en las bicapas lipídicas, de manera de estabilizar su unión. El NTR de las subunidades ESCRT-III se caracteriza por estar compuesto por residuos con estas características, actuando como un ancla de alta afinidad a la membrana. Este anclaje permite la interacción oligómero-membrana e impulsa la deformación de ésta última, hecho que desencadena el reclutamiento de ESCRT.

Se ha reportado que las distintas subunidades ESCRT-III presentan una secuencia *upstream* a la primera hélice α NTR, la cual presenta un rol diferencial en la clasificación de proteínas en los MVB y la eficiencia del proceso (Buchkovich et al., 2013). Si bien en ciertas proteínas miembros de ESCRT-III, la mutación de estos residuos hidrófobos sólo disminuye levemente la eficiencia del transporte y la clasificación de proteínas, en Snf7/Vps32 la mutación de estos residuos afecta el proceso de una manera drástica. Es decir, esta secuencia es esencial para la invaginación de la membrana y la formación de las vesículas (Buchkovich et al., 2013). Para darse una idea de la importancia de estos once aminoácidos del extremo N-terminal de ESCRT-III y para la ejecución de los procesos citados, hay que recordar que Snf7 constituye la subunidad más abundante del subcomplejo.

En Snf7 de *S. cerevisiae*, la disposición de los aminoácidos hidrófobos fue totalmente conservada, ya que los mismos fueron detectados en la región NTR, abarcando los once aminoácidos *upstream* a la primera hélice $\alpha 1$ (**FIGURA 15**).

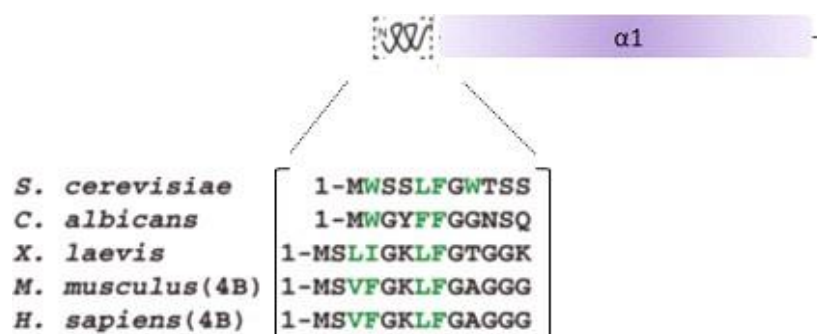


FIGURA 15. Alineamiento de las secuencias N-terminales de Vps32 de distintas especies eucariotas en las cuales se muestran los aminoácidos hidrófobos requeridos para la unión a las membranas (Buchkovich et al., 2013).

El mapeo de esta secuencia de Snf7 mediante el diagrama de rueda helicoidal demuestra sus características anfipáticas, ya que dicha secuencia forma una superficie de aminoácidos hidrófobos que se disponen alineados y en oposición a una interfaz polar compuesta por aminoácidos de serina (**FIGURA 16**). Esta secuencia anfipática dispuesta en el NTR de Snf7 es conocida como ANCHR (*Amphipathic N- terminus Containing Hydrophobic Residues*) y resulta esencial para la interacción con las membranas. Si bien durante la interacción con las membranas también participa una interfaz catiónica, en el momento previo a la escisión de la membrana y a la liberación de la vesícula, el motivo ANCHR de Snf7 media una estrecha asociación del polímero ESCRT-III con la membrana (Buchkovich et al., 2013). Es decir, que este motivo no sólo es esencial para el anclaje sino también para la liberación de la vesícula. Al respecto, se ha descrito que la alteración de las propiedades del motivo ANCHR afectan la capacidad de la ATPasa Vps4 de desmontar el *scaffold* de ESCRT-III anclado a la membrana, retrasando la cinética de formación de las vesículas intraluminales (ILV) (Buchkovich et al., 2013).

Con el objetivo de determinar si TcVps32 y TbVps32 cuentan con un motivo ANCHR con las características señaladas, se realizó el alineamiento de sus secuencias proteicas y las secuencias Vps32 de *H. sapiens*, *M. musculus* y *S. cerevisiae* (secuencias analizadas por los autores) (**FIGURA 16**).

En TbVps32 y TcVps32, se halló un motivo candidato ANCHR que constó de once aminoácidos de los cuales, como puede observarse en la figura, tres compartieron la misma ubicación y

características químicas que los detectados en los organismos modelo (**FIGURA 16 izquierda**). Por lo tanto, ambos tripanosomátidos conservaron aminoácidos hidrofóbicos en las mismas ubicaciones descriptas, dando como resultado un motivo ANCHR anfipático. En el diagrama helicoidal de la **FIGURA 16**, se demuestra que TcVps32 y TbVps32 presentan aminoácidos hidrófobos en su ANCHR NTR cuya disposición se corresponde con la de los organismos modelos y, particularmente, con Snf7 de *S. cerevisiae*; es decir, los aminoácidos se disponen uno al lado del otro y enfrentados a los aminoácidos de características químicas distintas (sean aminoácidos polares y de carga positiva o negativa).

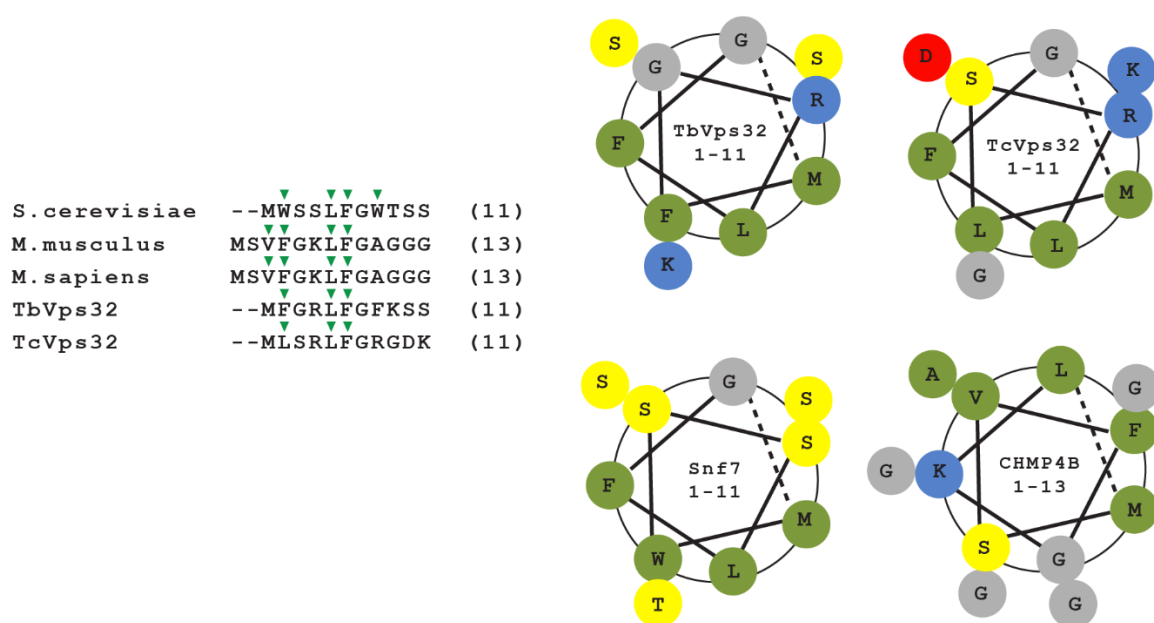


FIGURA 16. Motivo ANCHR en TcVps32 y TbVps32. Izquierda. El alineamiento de secuencias nos permitió detectar los aminoácidos hidrófobos NTR (flecha verde) de TbVps32 y de TcVps32. Tanto en TcVps32 como en TbVps32, esta región involucra 11 aminoácidos. **Derecha.** El Diagrama de rueda helicoidal (*Helical Wheel Diagram*) permite visualizar la naturaleza química de los aminoácidos y la relación establecida entre los mismos. Mediante la herramienta DrawCoil 1.0 se llevó a cabo la rueda helicoidal en la que se pueden apreciar las características NTR de Vps32. Los aminoácidos hidrófobos se distinguen en verde: Metionina (M), Fenilalanina (F), Leucina (L), Triptófano (W); los aminoácidos con carga positiva o básicos en azul: Lisina (K) y Arginina (R) y los aminoácidos neutros polares: Glicina (G) en gris y Serina (S) y Treonina (T) en amarillo.

ANÁLISIS DE DOMINIOS: CONCLUSIONES PARCIALES

1. TcVps32 y TbVps32 presentan un motivo ANCHR de características químicas y estructurales compatibles con los descriptos. Este motivo podría estar involucrado en el anclaje a la membrana, la liberación de las vesículas y al correcto desensamblaje del complejo ESCRT.

2. Ambas proteínas TcVps32 y TbVps32 parecerían no estar sujetas a mecanismos de regulación por fosforilación o desfosforilación durante la citoquinesis celular, ya que ambas carecen del elemento INS característico de la isoforma CHMP4C, susceptible a ser fosforilada por la Aurora quinasa B.
3. En ambas proteínas TcVps32 y TbVps32 se identificaron los motivos MIM que permiten clasificar a estas proteínas como verdaderos componentes de ESCRT-III. El hallazgo de un motivo MIM-1 nos sugiere la conservación del mecanismo de reclutamiento por proteínas accesorias o proteínas que cumplen este rol en ambos tripanosomátidos. El hallazgo de MIM-2 nos sugiere la posibilidad que Vps32 experimente cambios conformacionales y que pueda ser regulada por la ATPasa Vps4.

APENDICE I

Tabla 1. Búsqueda de secuencias ortólogas TcVps32 mediante la herramienta BLASTP de la base de datos TritypDB. Se incluyó la cepa CL Brener como criterio de búsqueda y se consideraron las secuencias con mayor score y menor E-value. Los porcentajes de identidad (%ID) fueron obtenidos mediante ClustalW realizando un alineamiento global de a pares.

Genes conservados en eucariotas	Haplotipo	Gene ID	ID (%)	score	E-value
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> NP_013125.1 ESCRT-III subunit protein SNF7	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	26	53.9	2.10 ⁻⁸
		TcCLB.509393.10	26	49.3	1.10 ⁻⁸
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	27	53.9	2.10 ⁻⁸
		TcCLB.507491.140	21	49.7	7.10 ⁻⁷
<i>Pan troglodytes</i> XP_003316914.2 charged multivesicular body protein 4b, partial	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	27	83.2	6.10 ⁻¹⁸
		TcCLB.509393.10	27	48.5	7.10 ⁻⁶
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	27	84.7	2.10 ⁻¹⁸
		TcCLB.507491.140	22	48.5	7.10 ⁻⁶
<i>Drosophila melanogaster</i> NP_610462.3 shrub	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	27	62.4	1.10 ⁻¹¹
		TcCLB.509393.10	27	48.9	1.10 ⁻⁶
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	27	62.4	1.10 ⁻¹¹
		TcCLB.507491.140	22	43.9	5.10 ⁻⁵
<i>Homo sapiens</i> NP_789782.1 charged multivesicular body protein 4b	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	35	89.7	4.10 ⁻²¹
		TcCLB.509393.10	35	47.8	3.10 ⁻⁶
		TcCLB.511001.100	24	43.9	5.10 ⁻⁵
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	34	90.9	2.10 ⁻²¹
		TcCLB.507491.140	22	46.6	7.10 ⁻⁶
		TcCLB.506957.110	24	43.9	5.10 ⁻⁵
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h- NP_594271.1 ESCRT-III complex subunit Vps32	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	30	68.2	1.10 ⁻¹³
		TcCLB.509393.10	30	43.9	6.10 ⁻⁵
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	31	70.9	1.10 ⁻¹⁴
		TcCLB.507491.140	19	43.9	5.10 ⁻⁵
<i>Macaca mulatta</i> XP_001105255.1 charged multivesicular body protein 4b-like	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	35	89.7	2.10 ⁻²¹
		TcCLB.509393.10	35	47.8	1.10 ⁻⁶
		TcCLB.511001.100	24	43.9	2.10 ⁻⁶
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	34	90.9	7.10 ⁻²²
		TcCLB.507491.140	22	46.6	3.10 ⁻⁶
		TcCLB.506957.110	24	43.9	2.10 ⁻⁵

Genes conservados en eucariotas	Haplotipo	Gene ID	ID (%)	score	E-value
<i>Canis lupus familiaris</i> XP_542966.1 charged multivesicular body protein 4b	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	25	87.4	1.10 ⁻²⁰
		TcCLB.509393.10	33	45.8	5.10 ⁻⁶
		TcCLB.511001.100	25	45.8	4.10 ⁻⁶
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	33	87.4	1.10 ⁻²⁰
		TcCLB.507491.140	22	48.1	6.10 ⁻⁷
		TcCLB.506957.110	25	45.8	4.10 ⁻⁶
<i>Bos taurus</i> NP_001121978.1 charged multivesicular body protein 4b	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	35	91.7	3.10 ⁻²²
		TcCLB.509393.10	35	47.4	2.10 ⁻⁶
		TcCLB.511001.100	25	46.2	4.10 ⁻⁶
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	35	93.2	1.10 ⁻²²
		TcCLB.507491.140	22	48.1	7.10 ⁻⁷
		TcCLB.506957.110	25	46.2	4.10 ⁻⁶
<i>Mus musculus</i> NP_083638.1 charged multivesicular body protein 4b	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	35	90.1	1.10 ⁻²¹
		TcCLB.509393.10	35	47.8	1.10 ⁻⁶
		TcCLB.511001.100	24	43.9	2.10 ⁻⁵
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	34	91.3	6.10 ⁻²²
		TcCLB.507491.140	22	46.6	3.10 ⁻⁶
		TcCLB.506957.110	24	43.9	2.10 ⁻⁵
<i>Rattus norvegicus</i> NP_001263385.1 chromatin modifying protein 4B-like 1	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	33	82.8	4.10 ⁻¹⁹
		TcCLB.509393.10	33	45.1	9.10 ⁻⁶
		TcCLB.511001.100	23	39.3	7.10 ⁻⁴
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	33	84.3	2.10 ⁻¹⁹
		TcCLB.507491.140	21	43.9	2.10 ⁻⁵
		TcCLB.506957.110	23	39.3	7.10 ⁻⁴
<i>Gallus gallus</i> NP_001006286.1 charged multivesicular body protein 4b	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	33	88.6	5.10 ⁻²¹
		TcCLB.509393.10	33	46.2	3.10 ⁻⁶
		TcCLB.511001.100	24	43.5	3.10 ⁻⁵
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	34	91.7	3.10 ⁻²²
		TcCLB.507491.140	23	47.4	1.10 ⁻⁶
		TcCLB.506957.110	24	43.5	3.10 ⁻⁵

Genes conservados en eucariotas	Haplotipo	Gene ID	ID (%)	score	E-value
<i>Xenopus tropicalis</i> NP_001004866.1 charged multivesicular body protein 4b	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	34	89	4.10 ⁻²¹
		TcCLB.509393.10	34	45.1	7.10 ⁻⁶
		TcCLB.511001.100	25	49.7	2.10 ⁻⁷
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	34	90.5	1.10 ⁻²¹
		TcCLB.507491.140	23	45.8	4.10 ⁻⁶
		TcCLB.506957.110	25	49.7	2.10 ⁻⁷
<i>Danio rerio</i> NP_956489.1 charged multivesicular body protein 4b	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	33	81.6	1.10 ⁻¹⁸
		TcCLB.509393.10	33	47.4	1.10 ⁻⁶
		TcCLB.511001.100	22	43.5	3.10 ⁻⁵
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	32	85.1	6.10 ⁻²⁰
		TcCLB.507491.140	21	47.8	1.10 ⁻⁶
		TcCLB.506957.110	22	43.5	3.10 ⁻⁶
<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST XP_315330.3 AGAP005316-PA	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	31	76.6	6.10 ⁻¹⁷
		TcCLB.509393.10	31	48.1	7.10 ⁻⁷
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	31	76.6	6.10 ⁻¹⁷
		TcCLB.507491.140	21	48.5	5.10 ⁻⁷
<i>Neurospora crassa</i> OR74A XP_960819.1 vacuolar-sorting protein snf-7	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	28	43.1	5.10 ⁻⁵
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	28	42.7	5.10 ⁻⁵
<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_001078468.1 SNF7 family protein	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	33	87.4	1.10 ⁻²⁰
		TcCLB.509393.10	33	68.2	4.10 ⁻¹⁴
		TcCLB.511001.100	26	55.5	2.10 ⁻⁹
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	33	87.8	8.10 ⁻²¹
		TcCLB.507491.140	24	68.6	3.10 ⁻¹⁴
		TcCLB.506957.110	26	55.5	2.10 ⁻⁹
<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_179573.1 SNF7 family protein	Esmeraldo-like	TcCLB.511589.250	32	73.6	6.10 ⁻¹⁶
		TcCLB.509393.10	27	69.3	2.10 ⁻¹⁴
		TcCLB.511001.100	27	53.9	6.10 ⁻⁹
	Non-Esmeraldo-like	TcCLB.511229.100	32	74.7	2.10 ⁻¹⁶
		TcCLB.507491.140	23	69.3	1.10 ⁻¹⁴
		TcCLB.506957.110	27	53.9	6.10 ⁻⁹

Tabla 2. Búsqueda de secuencias ortólogas TbVps32 mediante la herramienta Blastp de la base de datos TritypDB. Se incluyó la cepa Lister427 y Lister 427 2018 como criterio de búsqueda y se consideraron las secuencias con mayor score y menor E-value. Los porcentajes de identidad (%ID) fueron obtenidos mediante Clustal W realizando un alineamiento global de a pares.

Genes conservados en Eucariotas	cepa	Gene ID	ID (%)	score	E-value
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> NP_013125.1 ESCRT-III subunit protein SNF7	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	27.9/51.8	89.7	5.10 ⁻²¹
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	28.3/52.2	91.3	1.10 ⁻²¹
<i>Pan troglodytes</i> XP_003316914.2 charged multivesicular body protein 4b, partial	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	25.2/40.2	85.5	2.10 ⁻¹⁹
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	25.2/40.2	85.9	2.10 ⁻¹⁹
<i>Drosophila melanogaster</i> NP_610462.3 shrub	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	29.7/48.2	79.3	2.10 ⁻¹⁷
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	29.7/48.6	80.1	9.10 ⁻¹⁸
<i>Homo sapiens</i> NP_789782.1 charged multivesicular body protein 4b	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	31.5/50	83,6	5.10 ⁻¹⁹
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	31.5/50	84	4.10 ⁻¹⁹
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h- NP_594271.1 ESCRT-III complex subunit Vps32	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	30.8/50.9	90.1	3.10 ⁻²¹
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	30.8/51.3	90.9	1.10 ⁻²¹
<i>Macaca mulatta</i> XP_001105255.1 Charged multivesicular body protein 4b-like	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	31.5/50	84	4.10 ⁻¹⁹
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	31.5/50	84	4.10 ⁻¹⁹
<i>Canis lupus familiaris</i> XP_542966.1 charged multivesicular body protein 4b	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	31.5/49,6	82.8	1.10 ⁻¹⁸
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	31.5/49.6	82.8	9.10 ⁻¹⁹
<i>Bos taurus</i> NP_001121978.1 charged	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	31.5/50	84.7	2.10 ⁻¹⁹

multivesicular body protein 4b	Lister 427 2018	Tb427_110104600	31.5/50	84.7	2.10 ⁻¹⁹
<i>Mus musculus</i> NP_083638.1 charged multivesicular body protein 4b	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	31.5/50	84	4.10 ⁻¹⁹
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	31.5/50	84	4.10 ⁻¹⁹
<i>Rattus norvegicus</i> NP_001263385.1 chromatin modifying protein 4B-like 1	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	31.5/50	80.5	7.10 ⁻¹⁸
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	31.1/49.6	80.5	6. 10 ⁻¹⁸
<i>Gallus gallus</i> NP_001006286.1 charged multivesicular body protein 4b	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	31.8/49.4	84.7	2.10 ⁻²⁰
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	31.8/49.4	84.8	2.10 ⁻²⁰
<i>Xenopus tropicalis</i> NP_001004866.1 charged multivesicular body protein 4b	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	30.2/49.8	77.8	5.10 ⁻¹⁷
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	30.2/49.8	77.8	5.10 ⁻¹⁷
<i>Danio rerio</i> NP_956489.1 charged multivesicular body protein 4b	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	31.8/49.2	85.9	9.10 ⁻²⁰
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	31.8/49.2	85.5	1.10 ⁻¹⁹
<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST XP_315330.3 AGAP005316-PA	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	31.7/48.8	87	3.10 ⁻²⁰
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	31.7/48.8	87.4	2.10 ⁻²⁰
<i>Neurospora crassa</i> OR74A XP_960819.1 vacuolar-sorting protein snf-7	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	25.8/49.4	69.5	6.10 ⁻¹³
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	28.9/49.8	65.9	7.10 ⁻¹³

<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_001078468.1 SNF7 family protein	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	36.2/51.3	90.9	1.10 ⁻²¹
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	36.6/51.7	92.4	3.10 ⁻²²
<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_179573.1 SNF7 family protein	Lister 427	Tb427tmp.01.1390	33.5/48.3	90.9	1.10 ⁻²¹
	Lister 427 2018	Tb427_110104600	33.5/48.3	91.3	8.10 ⁻²²

Tabla 3. Porcentajes de identidad y similitud (%ID/similitud) de proteínas miembros de ESCRT-III de *S. cerevisiae* y *H. sapiens* obtenidos mediante ClustalW.

3.1 *Homo sapiens*

ID/Similitud (%)*	CHMP4B	CHMP4C	CHMP6	CHMP5
CHMP4A	62,1/79,3	52,1/73,1	26/51,1	28,2/49,6

ID/Similitud (%)*	CHMP4A	CHMP4C	CHMP6	CHMP5
CHMP4B	62,1/79,3	61/76,3	22,9/47,2	26,4/40,9

ID/Similitud (%)*	CHMP4A	CHMP4B	CHMP6	CHMP5
CHMP4C	52,1/73,1	61/76,3	21,3/45,6	19,6/37,6

ID/Similitud (%)*	CHMP4A	CHMP4B	CHMP4C	CHMP6
CHMP5	28,2/49,6	26,4/40,9	19,6/37,6	23,3/43,2

ID/Similitud (%)*	CHMP4A	CHMP4B	CHMP4C	CHMP5
CHMP6	26/51,1	22,9/47,2	21,3/45,6	23,3/43,2

3.2 *S. cerevisiae*

ID/Similitud (%)*	Vps32/Snf7	Vps60
Vps20	27,1/45,5	22,3/34,3

ID/Similitud (%)*	Vps20	Vps60	Vps24
Vps32/Snf7	27,1/45,5	26,3/45,2	19,3/42,5%

ID/Similitud (%)*	Vps32/Snf7	Vps20
Vps60	26,3/45,2	22,3/34,3

3.3

ID/Similitud (%)*	CHMP4B	CHMP4A	CHM4C	CHMP6	CHMP5	CHMP3
Vps32/Snf7	37,9/54,3	38/55	34,1/55,7	23,3/41,4	27,5/44,9	20,4/43,5

ID/Similitud (%)*	Vps20 (CHMP6)	Vps60 (CHMP5)	Vps32/Snf7
CHMP5	25,4/42,5	30/55,3	23,3/41,4

ID/Similitud (%)*	Vps20 (CHMP6)	Vps60 (CHMP5)	Vps32/Snf7
CHMP6	26,2/50,7	21,2/40,7	27,5/44,9

ANÁLISIS ESTRUCTURAL de Vps32 de *T. brucei* y *T. cruzi*

La proteína Vps32 es miembro de ESCRT-III y posee la capacidad de estar presente en la célula como monómero y/o como polímero. La alternancia de los cambios conformacionales que experimenta (de monómero o conformación inactiva/cerrada a polímero o conformación activa/abierta), se debe, entre otras particularidades, a sus distintivas características estructurales: hélices α básicas, hélices α ácidas y una región *Linker* C-terminal.

En este capítulo, nuestro interés se centró en determinar si la proteína Vps32 de ambos tripanosomátidos analizados en la presente tesis doctoral (TcVps32 y TbVps32) presenta una funcionalidad similar a la descrita en otros organismos. Para ello, fue imprescindible caracterizarla estructuralmente. En consecuencia, construimos los modelos estructurales de Vps32 de *T. brucei* y *T. cruzi* y los comparamos con los homólogos estructurales previamente reportados.

Para tal fin, la predicción de la estructura tridimensional de Vps32 de ambos tripanosomátidos se llevó a cabo a través del servidor web *RaptorX* (<http://raptorx.uchicago.edu>), una herramienta sobresaliente en la predicción de la estructura terciaria y de las regiones de contacto tanto para secuencias de proteínas que presentan homólogos cercanos en *Protein Data Bank* (PDB) como para aquellas que no lo presentan. Es decir, *RaptorX* permite generar modelos predictivos 3D a través de dos estrategias: en base a un homólogo estructural registrado en la base de datos de proteínas PDB (modelo a partir de un templado o molde) y prescindiendo del mismo (modelo sin templado). En este último caso, el modelo se basa enteramente en el análisis de la secuencia proteica y, valiéndose de las características químicas intrínsecas de la misma, el programa predice estructuras secundarias, genera mapas de contacto y de distancia, determina la accesibilidad a solventes, las regiones desordenadas y sitios de unión utilizando una red neuronal residual convolucional ultra profunda de la secuencia primaria (*Protein Secondary Structure Prediction Using Deep Convolutional Neural Fields*) o una alineación de secuencias múltiples (Källberg et al., 2012; Peng & Xu, 2011; Wang

et al., 2016, 2018; Xu & Wang, 2019).

A fin de dilucidar las estructuras tridimensionales de Vps32 de *T. brucei* (TbVps32) y de *T. cruzi* (TcVps32), se aplicaron ambas estrategias y en consecuencia se generaron dos estructuras posibles para cada proteína: un modelo estructural basado en un templado PDB y otro modelo estructural basado en el análisis de la secuencia de aminoácidos (modelo sin uso de templado PDB).

En la primera parte de este capítulo se detallará el proceso de generación y elección del modelo estructural tanto para TcVps32 como para TbVps32, basado en el homólogo estructural de PDB. De manera que, a lo largo de la sección, se detallará la evaluación de tres modelos estructurales alternativos para cada proteína y, asimismo, se describirá la elección del modelo estructural “más adecuado”.

En la segunda parte del capítulo se mostrarán y evaluarán los modelos generados para Vps32 de ambos tripanosomátidos a partir de la predicción que realiza *RaptorX* prescindiendo de homólogos estructurales. A través de esta estrategia se obtuvieron los modelos estructurales de la proteína completa Vps32 de ambos tripanosomátidos, lo cual instó a que se procediera a generar el modelo estructural de la secuencia completa para Snf7 de *S. cerevisiae*. Debido a que la región C-terminal (CTR) de Snf7 no ha sido resuelta mediante Cristalografía de Rayos X (Tang et al., 2015), la inclusión en el análisis de la construcción de un posible modelo para Snf7 que abarque la secuencia completa nos permitiría analizar características particulares de la región como así también, contribuir al análisis comparativo entre organismos.

Obtención de los modelos 3D a partir de un homólogo estructural de la base de datos PDB (uso de templado PDB).

1.1 Búsqueda de homólogos estructurales para TbVps32 de *T. brucei* y TcVps32 de *T. cruzi*.

Debido a que Vps32 presenta homólogos estructurales cercanos registrados en la base de datos PDB (Tang et al., 2015), en primera instancia, las secuencias TbVps32 y TcVps32, fueron insertadas en *RaptorX Old Structure Prediction*, una de las herramientas que provee este

consorcio. Básicamente, el programa genera tres modelos estructurales alternativos, cada uno a partir del alineamiento con un templado específico de la base de datos PDB. Luego, cada modelo es evaluado en base a los valores de ciertos parámetros, tales como: **Valor P^1** (o *p-value*), ***uGDT*²** (*Global Distance Test* o valor sin normalizar de GDT) y ***score*³**.

A partir de los valores de cada parámetro, el programa genera un *ranking* de los tres modelos alternativos principales para la secuencia proteica insertada. De esta manera, el *ranking* refleja la calidad de la predicción estructural o modelo generado.

Luego de insertar la secuencia proteica TbVps32 en la herramienta predictora de estructura *RaptorX*, se obtuvieron tres modelos alternativos (**TABLA 1**), cada uno construido a través del alineamiento del **dominio 1 TbVps32** (el cual se extiende desde el residuo 1 al 145) con el templado específico de la base de datos PDB. El Modelo Alternativo 1 de TbVps32 fue obtenido por comparación con el templado Snf7 de *S. cerevisiae* “S288C (5FD7: A) conformación A” con un *p-value* 6.16^{-7} (en este caso fue modelado el 65% de la secuencia proteica registrado en PDB), mientras que el Modelo Alternativo 2 surgió del alineamiento de TbVps32 con el templado “6zh3: B” correspondiente a Vps24 de *S. cerevisiae* (6ZH3), proteína miembro de ESCRT-III. Asimismo, el Modelo Alternativo 3 fue obtenido a partir del alineamiento de TbVps32 con el templado “3frv: A” correspondiente a CHMP3 de *H. sapiens*, ortólogo de la proteína Vps24 de *S. cerevisiae*. Por tanto, los tres modelos resultaron de la comparación con estructuras de la subfamilia ESCRT-III, lo cual fue indicativo de la buena calidad de la predicción y del resultado global arrojado por el programa.

De los tres modelos propuestos, el Modelo Alternativo 1 se destacó respecto a los otros dos, ya que fue obtenido a partir de la comparación con el homólogo estructural Snf7 (PDB 5fd7: A) (**TABLA 1A**). Respecto a los otros Modelos Alternativos, si bien Vps24 y, su ortólogo humano, CHMP3, presentaban el característico dominio MIM-1, los mismos no presentaban el distintivo motivo MIM-2, motivo target de Vps4 y característico de Snf7, el cual además había sido identificado en TcVps32 y TbVps32 (**Cap. Búsqueda y detección de genes Vps32 en *T. cruzi* y *T. brucei*, Sección 3. Motivos de TcVps32 y TbVps32**).

De la misma manera realizada para TbVps32, para la secuencia proteica de TcVps32 de *T. cruzi*

se obtuvieron tres modelos (**TABLA 1B**). Tal como se puede apreciar, el Modelo Alternativo 1 propuesto para TcVps32 también fue generado a partir de la comparación con Snf7 de *S. cerevisiae* (5FD7A), el cual presentó el menor *Valor P* registrado. Curiosamente, tal como ocurrió para TbVps32, el Modelo Alternativo 2 fue generado a partir de la comparación con Vps24 de *S. cerevisiae*, lo cual no sólo volvió a reforzar la calidad de los modelos generados por el programa, sino que demostró que ambas secuencias, TcVps32 y TbVps32, presentaban características estructurales afines entre sí y con las proteínas ESCRT-III reportadas. En el caso del Modelo Alternativo 3, la comparación estructural se realizó con el templatado “6grj: G” correspondiente a una proteína que forma parte de una toxina de *Aeromona*. De manera anticipada y tal como en TbVps32, se pudo presumir que el Modelo Alternativo 1 se destacaba entre los modelos generados para TcVps32.

Como se observa en la **TABLA 1**, el Modelo Alternativo 1 de TbVps32, construido a partir de la comparación con Snf7 (5FD7), fue el que presentó el menor valor P y un valor uGDT de 90. Dado que el programa considera que, para proteínas de más de 100 residuos, un valor de uGDT superior a 50 indica buena calidad absoluta de modelado, el Modelo Alternativo 1 resultó ser el más adecuado desde el punto de vista estructural. Además, el valor GDT obtenido, también superior a 50, sugería que el modelo era confiable y de calidad en toda su extensión.

Al evaluar los modelos alternativos 2 y 3, pudo observarse que los valores uGDT fueron superiores a 50 pero no presentaban significativos valores P respecto del Modelo Alternativo 1. Y al analizar el parámetro GDT de estos últimos dos Modelos, los valores resultaron ser inferiores a 50, lo cual implicaba que sólo una parte del modelado era válido estructuralmente. Según el programa, los valores de GDT se encuentran vinculados conceptualmente con el error de modelado calculado para cada uno de los modelos (**FIGURA 1A**). En este contexto y tal como se aprecia en el Modelo Alternativo 1, desde el aminoácido Arg23 hasta Val145, el error de modelado general fue igual a cero (0), mientras que en los modelos alternativos 2 y 3, los valores de error de modelado estimado se extendieron entre 0 y 9 (**FIGURA 1A**). En conclusión, el Modelo Alternativo 1 constituyó el modelo estructural candidato para TbVps32 de preferencia.

¹ El **valor P** es la probabilidad de que un modelo predicho sea peor que el mejor de un conjunto de modelos generados aleatoriamente para esta proteína (o dominio), por lo que el valor P evalúa la calidad relativa de un modelo. Cuanto menor sea el valor P, mayor calidad será el modelo. Para las proteínas alfa, principalmente, un valor de P inferior a 1.10^3 es un buen indicador. Para las proteínas beta, un valor de P inferior a 1.10^4 es un buen indicador.

² **GDT o Global Distance Test** consiste en un cálculo matemático que relaciona cada aminoácido con el error de modelado (en Å). GDT se calcula como uGDT dividido por la longitud de la proteína (o dominio) y multiplicado por 100. uGDT (GDT) mide la calidad absoluta del modelo. Para una proteína con más de 100 residuos, el valor de uGDT mayor a 50 es un buen indicador de calidad. Si un modelo tiene un buen uGDT (> 50) pero una mala GDT (<50), entonces sólo una pequeña parte del modelo puede ser considerado como un “buen modelo”. Bajo este concepto, uGDT funciona como un parámetro de la calidad absoluta del modelado.

³ El valor numérico de **score** idealmente debe ser similar al número de aminoácidos de la proteína.

A.

Modelo Alternativo para TbVps32	Templado	p-value	uGDT (GDT)	uSeq/SeqID	score	Anotación
1	5fd7:A	$6,18^{-7}$	90(62)	34(23)	135	<i>X-ray Crystal structure of ESCRT-III Snf7 core domain (conformation A)</i>
2	6zh3:B	$6,07^{-6}$	65(45)	18(12)	122	<i>Cryo-EM structure of ESCRT-III helical Vps24 filaments</i>
3	3frv:A	$8,13^{-6}$	60(42)	10(7)	100	<i>Structure of Human CHMP3 (residues 1-150)</i>

B.

Modelo Alternativo para TcVps32	Templado	<i>p-value</i>	uGDT (GDT)	uSeq/SeqID	<i>score</i>	Anotación
1	5fd7:A	2,14 ⁻⁷	83(37)	29(13)	129	<i>X-ray Crystal structure of ESCRT-III Snf7 core domain (conformationA)</i>
2	6zh3:B	1,83 ⁻⁶	78(34)	24(11)	134	<i>Cryo-EM structure of ESCRT-III helical Vps24 filaments</i>
3	6grj:G	2,27 ⁻⁶	50(22)	15(7)	121	<i>Structure of the AhlB pore of the tripartite alpha pore forming toxin, AHL, from Aeromonas hydrophila.</i>

TABLA 1. Modelos Alternativos de estructura 3D obtenidos mediante RaptorX. A. Modelos para TbVps32. **B.** Modelos para TcVps32. Se detallan los parámetros obtenidos para los tres Modelos alternativos con mejor ranking que permiten evaluar la calidad del modelo estructural generado.

Tal como se aprecia en la **TABLA 1B**, el Modelo Alternativo 1 construido para TcVps32 se destacó respecto a los modelos restantes por su menor valor P y mayor valor uGDT. Este último (uGDT:83) resultó significativo según los estándares del programa e indicó la buena calidad del modelo, pero únicamente para una porción del modelado (GDT es menor a 50). Con la finalidad de determinar si los Modelos Alternativos 2 y 3 constituían modelos confiables y de buena calidad, fueron evaluados los parámetros *score*, *Valor P* y uGDT. En la **TABLA 1** se puede apreciar que ambos modelos presentaron un valor P alto respecto al Modelo Alternativo 1. Por otro lado, mientras el Modelo Alternativo 3 arrojó un valor uGDT de 50, el Modelo Alternativo 2 presentó un valor de uGDT de 78, por lo que, según lo establecido por el programa, el Modelo Alternativo 3 no cumplía con los estándares de calidad estructural. Respecto al Modelo Alternativo 2, presentó un valor de *score* superior al del Modelo Alternativo 1 y los valores de uGDT y GDT fueron similares a los del Modelo Alternativo 1.

Si bien en un primer momento consideramos que el Modelo Alternativo 2 también podría constituir un modelo estructural candidato para TcVps32, al alto valor P se le sumó el error de modelado superior al estipulado para el Modelo Alternativo 1 (**FIGURA 1**). Tal como se puede apreciar en la **FIGURA 1B**, el error estimado del dominio 1 TcVps32 del Modelo Alternativo 1 (que se extiende desde los aminoácidos Ser26 y Ala148) presentó valores numéricos oscilantes entre 0 y 1. Por el contrario, el error de modelado estimado de las unidades de dominio TcVps32 de los Modelos Alternativos 2 y 3 abarcó valores que oscilaban entre 0 y 9. Por lo tanto, estos resultados fueron significativos para establecer que el Modelo Alternativo 1 era el modelo estructural más robusto entre los generados aleatoriamente; siempre teniendo en cuenta que el modelo cumplía con los criterios de calidad únicamente al aplicarse a una porción del modelado (valores de GDT y uGDT inferiores a 50).

En suma, el Modelo Alternativo 1 constituyó el modelo representativo de la estructura de TcVps32.

Respecto a los parámetros GDT y uGDT, es necesario destacar que ninguno de los tres modelos alternativos habría sido acorde para representar la estructura completa de TcVps32 ni capaz de generar una predicción con altos estándares de calidad de la estructura proteica completa. Más bien, únicamente la porción modelada y representada en el Modelo Alternativo 1 fue la que cumplió con el criterio de alta calidad exhibido por el programa.

A.

TbVps32 modelo alternativo 1

```

1          11          21          31          41          51          61
MFGRLFGFKS SQEAPRPGVS PGRPNSSLEE LQSKLELLEK REGVLTKKVE DELAKAREFY SKKNKSMALQ
-----SPTKAIVR LREHINLLSK KQSHLRTQIT NQENEARIFL TKGNKVMKN
-----11000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
71          81          91          101          111          121          131
CMKRRKKMAED ELTKIACQKQ NLDTLIFTLQ NQTMNMEVLA AQKRAKDELK LVNKKMDADG VDNTMDELLE
ALKKKKTIEQ LLSKVVEGME SMEQQLFSEI SANLNLETMR AMQEGAKAMK TIHSGLDIDK VDETMDEIRE
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
141
EMDKV
QVELG
00127

```

TbVps32 modelo alternativo 2

```

1          11          21          31          41          51          61
MFGRLFGFKS SQEAPRPGVS PGRPNSSLEE LQSKLELLEK REGVLTKKVE DELAKAREFY SKKNKSMALQ
-IKKAIWGP-----DPKEQQRRIRSV LRKNGRNIEK SLRELTVLQN KTQQLIKKSA KKNDVRTVRL
-89999998-----772111100000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
71          81          91          101          111          121          131
CMKRRKKMAED ELTKIACQKQ NLDTLIFTLQ NQTMNMEVLA AQKRAKDELK LVNKKMDADG VDNTMDELLE
YAKELYQINK QYDRMYTSRA QLDSVRMKID EAIRMNTLSN QMADSAGLMR EVNSLVRLPQ LRNTMIELEK
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
141
EMDKV
ELMKS
00013

```

TbVps32 modelo alternativo 3

```

1          11          21          31          41          51          61
MFGRLFGFKS SQEAPRPGVS PGRPNSSLEE LQSKLELLEK REGVLTKKVE DELAKAREFY SKKNKSMALQ
-----QEKPPKELVNEWSLK IRKEMRVVDR QIRDIQREEE KVKRSVKDAA KKGQKDVCIIV
-----777775111110010 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
71          81          91          101          111          121          131
CMKRRKKMAED ELTKIACQKQ NLDTLIFTLQ NQTMNMEVLA AQKRAKDELK LVNKKMDADG VDNTMDELLE
LAKEMIRSRK AVSKLYASKA HMNSVLMGMK NQLAVLRVAGS-----
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
141
EMDKV
-----
-----

```

FIGURA 1. Búsqueda de homólogos estructurales. A. Alineamiento del dominio 1 de TbVps32 con distintos plantados propuestos por *RaptorX*. **B.** Alineamiento del dominio 1 de TcVps32 con distintos plantados. El error del modelo en cada caso se expresa como número entero para evaluar la confiabilidad del modelo. Los aminoácidos se encuentran coloreados según sus características químicas siendo hidrofóbicos (rojos), ácidos (azules), básicos (fucsia) e hidrófilos (verde).

B.

TcVps32 modelo alternativo 1

```

1          11          21          31          41          51          61
MLSRLFGRGD KQAKAREKQQ SGGPGSVSQT LEKLESAYEL LEKREGVLEK KMEMELERAK QHHAKKNTQA
-----SPTKA IVRLREHINL LSKKQSHLRT QITNQENEAR IFLTNGNKVM
-----11000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
71          81          91          101          111          121          131
ALQCMKRKKA FEEQLTNISA QKQNLET LKFTLQNNMNE LLEVQQRVKN ELRERNKKMD ADRVEENMEE
AKNALKKKKT IEQLLSKVEG TMESMEQQLF SIESANLNLE TMRAMQEGAK AMKTIHSGLD IDKVDETMDE
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
141          151          161          171          181          191          201
LQEEMEKANA VAEALRQPLD SQLLDEDELM GELMAELQTA DVKVAESAPA LPAMPSVPTG KLPKLSAKEE
IREQVELG-----
00000000-----
211          221
EDEDEEALRA LEAELQS
-----
-----

```

TcVps32 modelo alternativo 2

```

1          11          21          31          41          51          61
MLSRLFGRGD KQAKAREKQQ SGGPGSVSQT LEKLESAYEL LEKREGVLEK KMEMELERAK QHHAKKNTQA
-IKKAIWGPD-----PKEQQRRI RSVLRKNGRN IEKSLRELTV LQNKTTQQLIK KSAKKNDVRT
-8999999999-----21111110 0100000000 0000000000 0000000000 0000000000
71          81          91          101          111          121          131
ALQCMKRKKA FEEQLTNISA QKQNLET LKFTLQNNMNE LLEVQQRVKN ELRERNKKMD ADRVEENMEE
VRLYAKELYQ INKQYDRMYT SRAQLDSVRM KIDEAIRMNT LSNQMADSAG LMREVNLSLVR LPQLRNTMIE
0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
141          151          161          171          181          191          201
LQEEMEKANA VAEALRQPLD SQLLDEDELM GELMAELQTA DVKVAESAPA LPAMPSVPTG KLPKLSAKEE
LEKELMKSGI ISEMVD DME SVGDVGEEMDEAVDEEVNKI-----
0000000000 0001011111 1100000000 0000000001-----
211          221
EDEDEEALRA LEAELQS
-----
-----

```

TcVps32 modelo alternativo 3

```

1          11          21          31          41          51          61
MLSRLFGRGD KQAKAREKQQ SGGPGSVSQT LEKLESAYEL LEKREGVLEK KMEMELERAK QHHAKK----
-DSSNFQGI VNLNSKVQGD NGVLAQLNGD IDKVNAIDG AIAGIVAGGL LVIGGAFVTA IGAVADFVTA
-888911911 1100000000 0001110010 0000000000 0000000000 0000000000 000012----
G          75          85          95          105          114          124
--NTQAALQC MKRKKAFEEQ LTNISAQKQN LETLKF T LQNNMNE-LLE VQQRVKNELR ERNKKM--DA
GTSTPVVIGG VAMMVAGAGG ITAGAIVLHN SLGARQDLYQ KRSSLNSEVL IATQIGNGYK GLQVQAQNAV
--11000000 0000000000 0000000000 0000000000 000011-211 1110001111 111223--32
132          142          152          162          172          182          192
DRVEENMEEL QEEMEKANAV AEALRQPLDS QLLDEDELMG ELMAELQTAD VKVAESAPAL PAMPSVPTGK
TAATQMSNAW DSLTSDLGSL ITDLDKGI--TSGDDIRQ LWLTAADTTV K-----
1111000100 0000000000 11111177--21111011 1111000001 2-----
202          212          222
LPKLSAKEEE DEDEEALRAL EAELQS
-----TVLTDVTTI KAQIAG
-----111100000 000013

```

FIGURA 1. Búsqueda de homólogos estructurales. A. Alineamiento del dominio 1 de TbVps32 con distintos templados propuestos por *RaptorX*. **B.** Alineamiento del dominio 1 de TcVps32 con distintos

templados. El error del modelo en cada caso se expresa como número entero para evaluar la confiabilidad del modelo. Los aminoácidos se encuentran coloreados según sus características químicas siendo hidrofóbicos (rojos), ácidos (azules), básicos (fucsia) e hidrófilos (verde).

Por tanto, la elección del Modelo Alternativo 1 para Vps32 de ambos tripanosomátidos generados a partir del templado estructural PDB Snf7 de *S. cerevisiae* se respaldó en la evaluación conjunta del valor P, uGDT y score propuesta por *RaptorX* para juzgar la calidad del modelo predictivo. Sin embargo, ya que, era fundamental evaluar si el modelo generado por el programa se ajustaba estructuralmente a dicho templado, se evaluó el parámetro uSeqID.

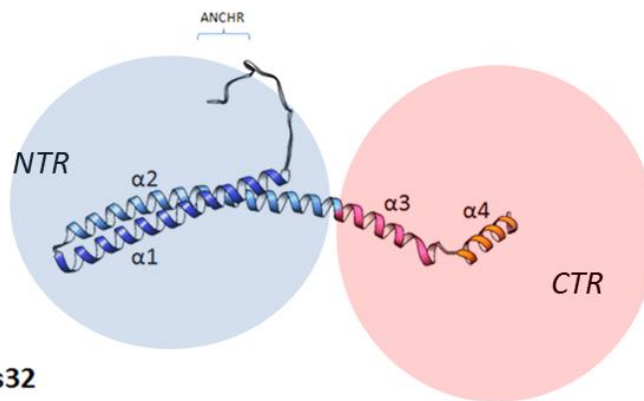
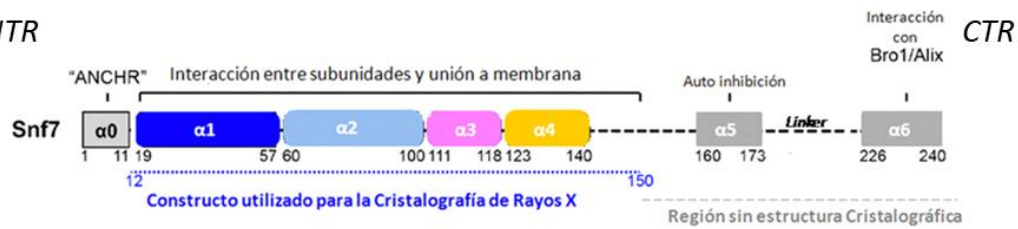
El Modelo Alternativo 1 de TbVps32 presentó un valor de uSeqID de 34, el cual indicó el máximo alineamiento entre secuencias; no obstante, para el mismo modelo, el valor SeqID de 23 fue indicativo que el plegamiento logrado en este modelo aun no llegaba a ser óptimo. Para los Modelos Alternativos 2 y 3, los valores SeqID no fueron significativos (18 y 10 respectivamente) y los valores de uSeqID reflejaron la pérdida completa de acercamiento a un modelo estructural válido (**TABLA 1**). Sintéticamente, el Modelo Alternativo 1 de TbVps32 continuó siendo el modelo de mayor calidad estructural.

En el caso de TcVps32, los valores de los parámetros SeqID y uSeqID correspondientes a los distintos modelos alternativos fueron inferiores a 30. De hecho, el Modelo Alternativo 1 presentó un valor uSeqID de 29, el cual constituía el valor más alto (**TABLA 1B**). Estos valores permitieron inferir que los alineamientos entre los templados utilizados y la secuencia de TcVps32 no habían sido significativos, y que los modelos generados no representaban adecuadamente el plegamiento de la proteína. Tal como se explicó, los parámetros utilizados para evaluar los modelos se aplicaron exclusivamente a la porción simulada de TcVps32. En consecuencia, tanto los valores de error de modelado como los del parámetro GDT — íntimamente relacionado con la calidad estructural— estuvieron condicionados por esta limitación. Del mismo modo, en este caso, los valores de uSeq/uSeqID inferiores a 30 también se vieron afectados por dicha restricción. Considerando todas estas observaciones, se determinó que, con un valor de SeqID de 29, la estructura del Modelo Alternativo 1 presentaba un plegamiento aceptable, siendo este el único modelo que cumplió con dicha condición.

En suma, teniendo en cuenta los valores de los parámetros ya citados, confirmamos que las estructuras obtenidas a través de la comparación con el templado PDB Snf7/Vps32 de *S. cerevisiae* (PDB ID 5FD7), resultaron ser las más confiables y robustas, y, por lo tanto, más adecuadas para representar la estructura tridimensional de Vps32 de ambos tripanosomátidos. Fue así como, los Modelos Alternativos 1 para TbVps32 y TcVps32 constituyeron los modelos de mejor calidad estructural (**FIGURA 2B y 2C**).

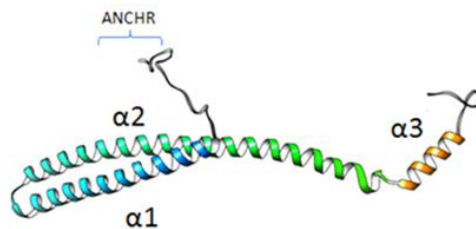
A.

NTR



B.

TbVps32



C.

TcVps32

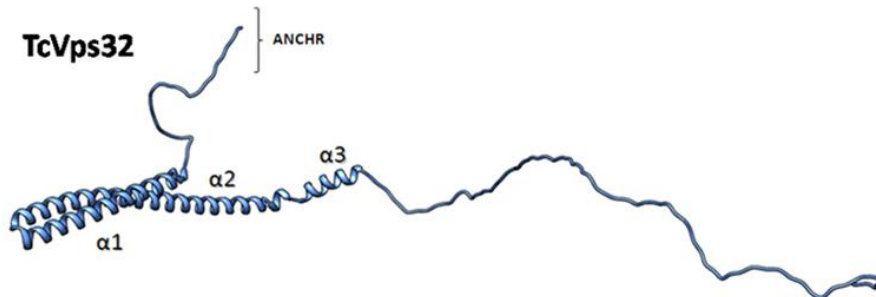


FIGURA 2. Esquema estructural de Snf7/Vps32 de *S. cerevisiae* (PDB ID 5FD7, *open conformation A*).

A. La estructura de Snf7o Vps32 consta de seis hélices α . Hacia el N-terminal se distingue el dominio ANCHR y las hélices $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$, región conocida como “*core domain*”; hacia el C-terminal, se ubican las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ unidas por la región *Linker*. La estructura obtenida por Cristalografía de Rayos X se corresponde a la conformación abierta de Snf7 y comprende el “*core domain*” que interactúa con las membranas y que se extiende desde el aminoácido 12 al 150. La región hacia el C- terminal señalada en gris aún no ha podido ser revelada. La región Snf7 *core* se corresponde al código de acceso PDB ID 5FD7 (*open conformation A*) y constituye el templatado utilizado por RAPTORX para generar la estructura 3D de TbVps32 y TcVps32 (Esquema modificado de Tang et al., 2015). **B** Modelo alternativo 1 de la unidad 1 de TbVps32 de *T. brucei*: modelo estructural de la secuencia proteica Vps32 de *T. brucei* utilizando como templatado a Snf7/Vps32 de *S. cerevisiae* cepa S288C obtenida mediante Cristalografía de Rayos X **C.** Modelo alternativo 1 de la unidad 1 de TcVps32 de *T. cruzi* obtenido mediante la misma estrategia. En ambos casos, se distingue la región N-terminal (NTR) compuesta por las dos hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$, el motivo ANCHR (*Amphipathic N- terminus Containing Hydrophobic Residues*) y la región C-terminal (CTR) sólo compuesta por la hélice $\alpha 3$.

1.2 Homólogo estructural Snf7 (PDB ID 5FD7).

Tal como se ha mencionado, Vps32 de *S. cerevisiae*, conocida como Snf7, fue el homólogo estructural de la base de datos PDB seleccionado para elaborar los modelos de Vps32 de ambos tripanosomátidos (Modelos Alternativos 1). La estructura tridimensional de Snf7 en su conformación abierta había sido revelada y reportada mediante cristalografía de rayos X (Tang et al., 2015) (**FIGURA 2A**) y, por limitaciones de la técnica, sólo había sido posible la obtención de una estructura que comprendía las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$, región conocida como *core domain*. Si bien la técnica no permitió dilucidar la estructura proteica completa, la resolución cristalográfica de la región N-terminal (NTR) de Snf7 ha sido un hallazgo de valor estructural significativo, dado que la misma constituye la región más conservada a lo largo de la evolución y enriquece los análisis subsiguientes enfocados en entender la dinámica de los cambios conformacionales. De hecho, la estructura tridimensional del *core domain* de la NTR facilitó la comprensión de las interacciones químicas llevadas a cabo durante los cambios conformacionales y, usando un enfoque multidisciplinario que combinó PDS (*dipolar electron spin resonance spectroscopy*), genética, bioquímica y TEM, los autores lograron revelar características estructurales claves de la proteína completa en relación con la conversión dinámica desde un monómero soluble a un polímero unido a la membrana (Tang et al., 2015). Algunos de los hallazgos estructurales obtenidos a través de estos análisis han servido de base para entender el funcionamiento y proponer un mecanismo que explique dichas dinámicas conformacionales y, algunos de ellas, serán abordados pertinentemente en este capítulo.

Sin embargo, hay que destacar que, a pesar de contar con reportes y herramientas que permiten entender la dinámica de Snf7, la ausencia de un modelo que contemple la disposición espacial de las hélices de la CTR dificulta el estudio y entendimiento de su función como dominio regulatorio (Capalbo et al., 2012; Shim et al., 2007). De manera que, toda la información referida a esta región y a las dinámicas conformacionales que la incluyan servirá para proponer modelos teóricos.

1.3 Modelos estructurales Vps32 de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*.

El Modelo Alternativo 1 de TbVps32 abarcó la región comprendida entre el residuo Arg23 hasta el residuo Val145, y, por lo tanto, el modelo estructural generado por *RaptorX* se limitó a esa misma región (**FIGURA 3**). Es decir, tal como se aprecia, el modelo estructural sólo fue abarcativo de la NTR de TbVps32. Sin embargo, además del modelo estructural, esta herramienta nos proporcionó la estructura secundaria de la secuencia completa y, por lo tanto, información respecto al comportamiento global de la proteína. En este análisis, y tal como hemos demostrado previamente (**Cap. Búsqueda y detección de los genes Vps32 en *T. cruzi* y *T. brucei***), se detectó la presencia de cinco hélices α . El residuo Arg23 que conforma el dominio 1 TbVps32 se ubicó en la primera hélice α_1 y el residuo Val145 en la hélice α_3 mientras que, la región comprendida entre Asn146 y Ser228, que no forma parte de la unidad de modelado TbVps32, comprendió el final de la tercera hélice α (α_3), la cuarta (α_4) y la quinta hélice α (α_5). Hacia la NTR se observó que los primeros 22 aminoácidos, desde Met1 hasta Gly22, no se encontraban incluidos en la hélice α_1 y, presumiblemente, formarían parte del motivo ANCHR (**FIGURA 3**).

El Modelo Alternativo 1 de TcVps32 abarcó la región comprendida entre el residuo Ser26 hasta el residuo Ala148, y, por lo tanto, el modelo estructural generado por *RaptorX* se limitó a esa misma región (**FIGURA 3**). En toda su extensión abarcó las hélices α_1 , α_2 y α_3 completamente, es decir, el aminoácido Ser26 se encontró en la primera hélice y el aminoácido Ala148 se encontró incluido en la hélice α_3 . Sin embargo, la estructura completa obtenida mediante el programa consistió en las 5 hélices, tal como ya habíamos demostrado.

Por tanto, estos resultados aportados por *RaptorX* confirmaron los hallazgos previos respecto a la estructura secundaria: tanto TbVps32 como TcVps32 presentaban cinco hélices α , de las cuales, las últimas dos, se encontraban conectadas por un *Linker CTR*.

Por tanto, el modelo estructural del **dominio 1 TcVps32** de *T. cruzi* y el modelo estructural del **dominio 1 de TbVps32** de *T. brucei* representaron el estado conformacional abierto de Vps32, y ambas estructuras constaron de tres hélices α hacia la NTR, de las cuales, la primera y la segunda se encontraban estableciendo interacciones entre sí (**FIGURA 2B y 2C**).

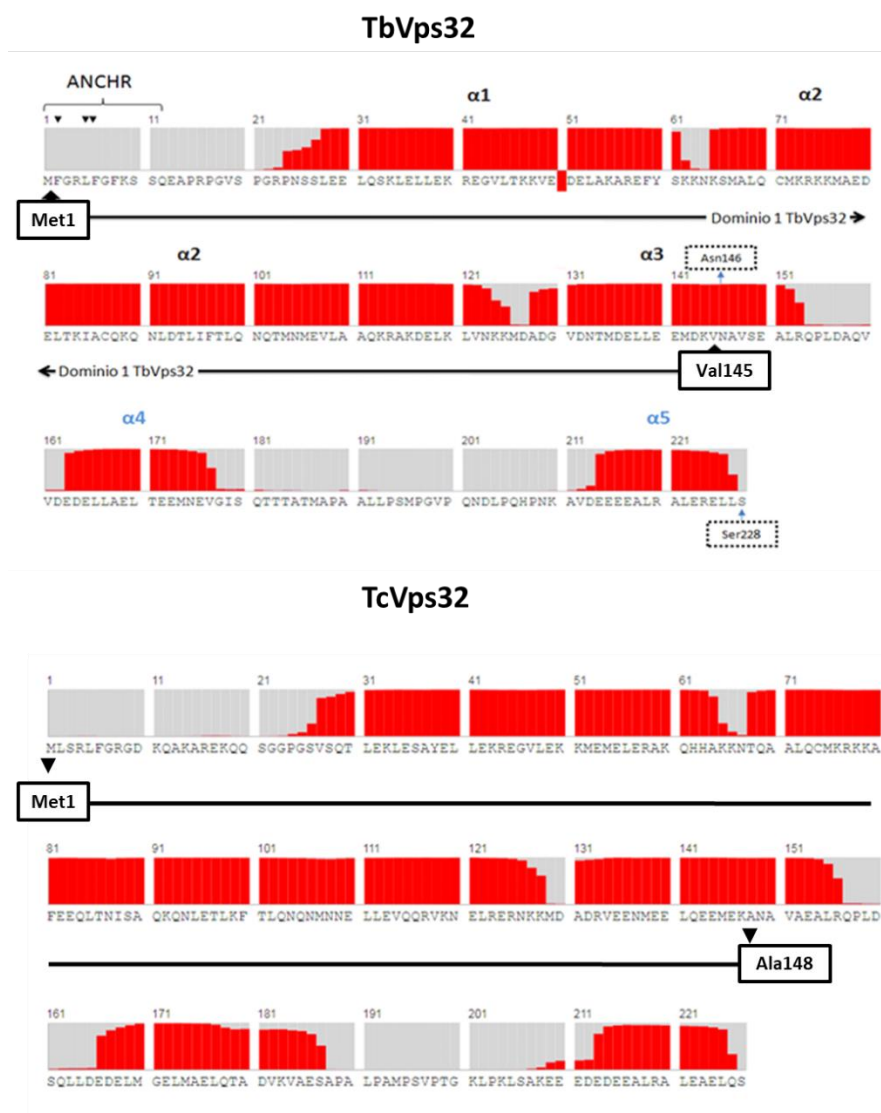


FIGURA 3. Análisis estructural de la secuencia proteica de TbVps32 realizado con RaptorX. La herramienta de predicción estructural 3D RaptorX también provee la estructura secundaria de la secuencia insertada, de manera que las partes de la secuencia proteica que forman parte de una hélice α se visualizan en color rojo mientras que las regiones de la secuencia sin estructura periódica se

visualizan en gris. La distinción colorimétrica surge de la probabilidad que posee cada aminoácido de ocupar una hélice α . En la parte superior de la figura, se detalla cada una de las hélices; y en la parte inferior, se detallan los aminoácidos que conforman toda la secuencia proteica. El modelado de la estructura tridimensional de TbVps32 se restringe al dominio 1 TbVps32 (línea negra), el cual se extiende desde el residuo metionina (Met1), ubicado presumiblemente en el motivo ANCHR, hasta el residuo de valina en la posición 145 (Val145) de la hélice $\alpha 3$. El modelado de la estructura tridimensional de TcVps32 se restringe al dominio 1 TcVps32 (línea negra), el cual se extiende desde el residuo Met1 hasta el residuo de alanina de la posición 147 (Ala147) de la hélice $\alpha 3$.

En la **FIGURA 2** se aprecia que la única diferencia notoria entre ambos modelos radica en la CTR, la cual en TcVps32 fue visualizada como una larga prolongación sin estructura periódica que podría constituir un artefacto de la herramienta, dado que el modelo construido se basa en el modelo de Snf7, el cual sólo comprende el *core domain*.

Al observar el modelo cristalográfico Snf7 (**FIGURA 2**), se puede apreciar la llamativa ubicación y la relación entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$, las cuales no se encuentran separadas tal como se pensaba. De hecho, este hallazgo fue realizado a través de la cristalografía, y para los autores fue sorpresivo dado que la predicción clásica contemplaba la separación física de estas hélices de Snf7 (Tang et al., 2015). Cabe destacar que, a pesar de este hallazgo, cada hélice mantuvo la nomenclatura original utilizada para describir la estructura secundaria.

Teniendo en cuenta la estructura cristalográfica de Snf7, cobró vital relevancia lo observado en los modelos estructurales para TbVps32 y TcVps32, en los cuales se observó que las hélices $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ presentaban la misma relación estructural y la misma disposición espacial que el *core domain* de Snf7 ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$) (**FIGURA 2**). Por tanto, las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de TbVps32 y TcVps32 fueron análogas a la hélice $\alpha 2$ de Snf7 y, con el mismo criterio, las hélices $\alpha 3$ se correspondieron con la hélice $\alpha 4$ de Snf7. Debido a que estas estructuras compartieron igual disposición espacial que el *core domain* de Snf7, fue sugestivo pensar acerca de la aparente conservación funcional de esta región a lo largo de la evolución.

Respecto a la CTR, los homólogos estructurales de PDB hallados por el programa no permitieron generar modelos para TcVps32 y TbVps32 que incluyesen las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$, de manera que, toda la CTR se evidenció sin estructura. Considerando esta limitación, y dado nuestro interés en dilucidar la estructura de dicha región para obtener información funcional

y establecer paralelismos con los modelos que la señalan como un elemento regulador clave durante los cambios conformacionales, se construyeron modelos estructurales completos de ambas proteínas de los tripanosomátidos analizados en este trabajo, los cuales se presentan a continuación.

2. Predicción estructural sin templado

2.1 Modelo estructural de TbVps32 y TcVps32

Insertando las secuencias proteicas completas TbVps32 de *T. brucei* y TcVps32 de *T. cruzi* en la herramienta *RaptorX Structure Prediction*, se obtuvieron los correspondientes modelos 3D incluyendo las hélices α de la CTR. Esta herramienta calcula el plegamiento de la proteína sin utilizar un templado de la base de datos de proteínas PDB, con lo cual la predicción realizada se basa en las propiedades de estructura local, matriz de distancia y contacto, la orientación entre aminoácidos y la estructura terciaria de la proteína creando una red neural de residuos a partir de la secuencia primaria o del alineamiento de secuencia múltiple. De manera que, el modelo tridimensional es generado considerando las distancias entre residuos, entre átomos y la orientación probable de la molécula. Además, *RaptorX* es capaz de generar modelos estructurales alternativos que, paralelamente, son evaluados en cuanto a su calidad a través de los diferentes parámetros antes mencionados (valor P o *p-value*, la puntuación o *score*, uGDT, GDT, uSeqID y SeqID). Los modelos de mayor calidad de predicción para TcVps32 y TbVps32, se pueden observar en la **FIGURA 4**. Con el mismo criterio, también se llevó a cabo el modelo estructural completo de Snf7, el cual se observa en la **FIGURA 6A**.

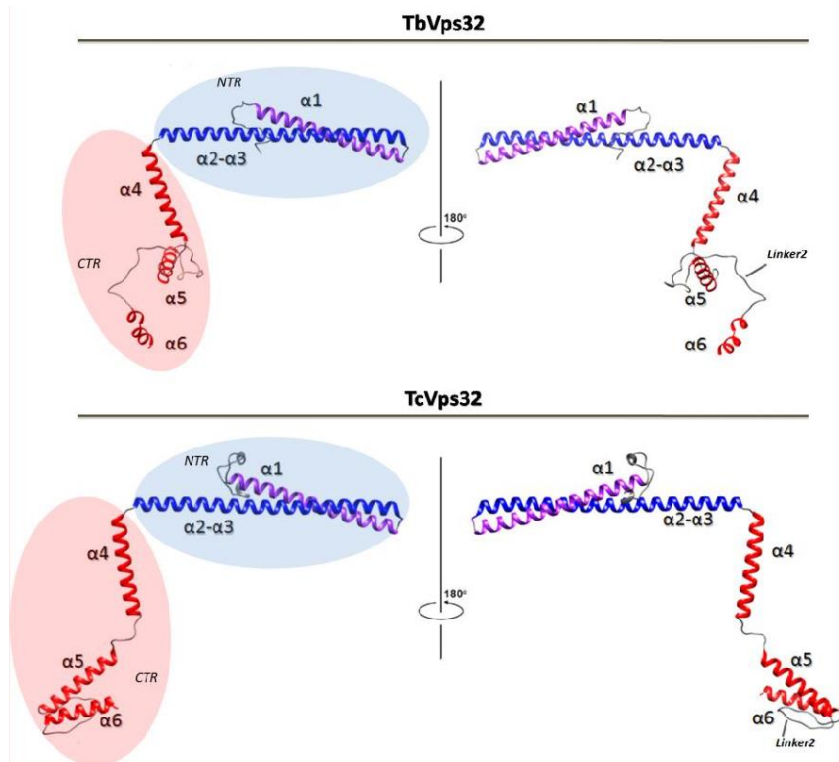


FIGURA 4. Modelo estructural de TbVps32 y TcVps32 (conformación abierta) obtenida mediante RAPTORX Structure Prediction. Ambas estructuras presentan cinco hélices α y la región *Linker* C-terminal (*Linker 2*) que conecta la última hélice ($\alpha 6$) a la anteúltima ($\alpha 5$), tal cual se ha descrito en otros organismos. La nomenclatura utilizada por nosotros se corresponde a la nomenclatura clásica de Snf7. La naturaleza química de cada hélice se encuentra representada por el color de la misma (rojo: pl ácido, azul: pl básico y violeta: pl neutro). Asimismo, las regiones terminales se encuentran delimitadas por un círculo color azul por la naturaleza básica de la NTR (región N-terminal) o en color rojo,

por la naturaleza acida de la CTR (región C-terminal). Ambas regiones presentan distinto grado de compactación debido a que cada una presenta funcionalidades específicas: la NTR presenta una función conservada, de inserción a las membranas, y la CTR constituye la región reguladora susceptible a la interacción con proteínas modificadoras.

2.1.1 Validación de los modelos

Contando con todos los modelos estructurales necesarios para nuestros estudios comparativos, procedimos a su validación a través de la determinación del porcentaje de los residuos de la región *outlier*. Los aminoácidos *outliers* son aquellos aminoácidos con ángulos diédricos no favorables, generalmente producto de errores durante el procesamiento de datos (Choudhuri, 2014). Para ello, fue confeccionado el gráfico *Ramachandran* de cada modelo (**FIGURA 5**), el cual fue realizado con la aplicación *Swiss Model* (<https://swissmodel.expasy.org/>). El gráfico o diagrama de Ramachandran representa el ángulo ψ (psi) frente a ϕ (phi), que son los ángulos de torsión del esqueleto peptídico de una proteína. Este diagrama es una forma de visualizar las regiones energéticamente permitidas para los ángulos diedros del esqueleto de una proteína. Por lo tanto, nos permite determinar

cuántos residuos se encuentran formando parte de un elemento de estructura secundaria determinado y cuántos presentan ángulos de torsión forzados. De esta manera, cuantos más residuos presenten ángulos forzados, más probable será que la estructura de la proteína no sea la más adecuada. A través de nuestros resultados, pudimos verificar que los porcentajes de residuos *outliers* se aproximaron significativamente al porcentaje obtenido para 5FD7A PDB de 1.7% (<https://www.rcsb.org/structure/5fd7>) lo cual indica la buena calidad de todos los modelos obtenidos.

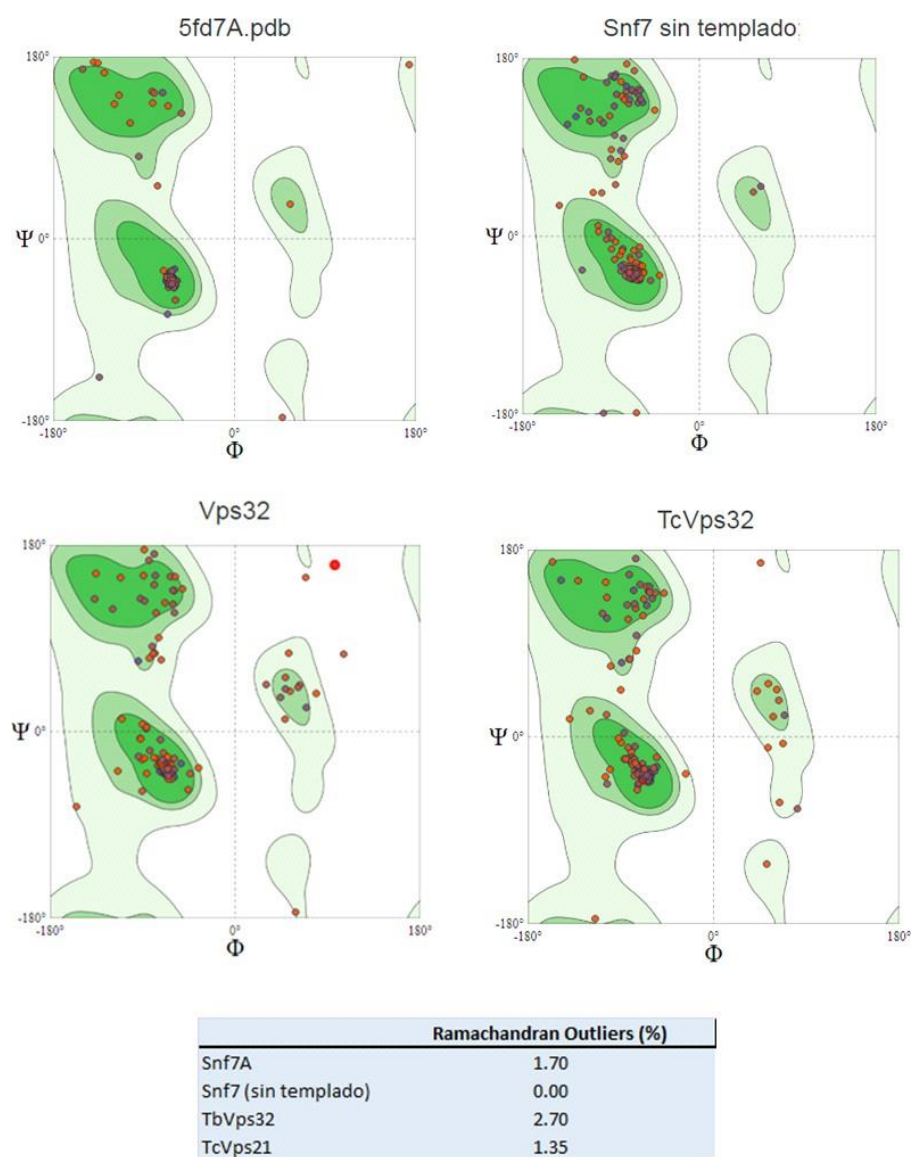


FIGURA 5. Gráficos Ramachandran. En el diagrama se representan los ángulos ψ (psi) y ϕ (phi) del esqueleto peptídico. El diagrama para cada una de las estructuras fue llevado a cabo con la finalidad

de evaluar los residuos *outliers* de manera de validar los modelos estructurales. Como se puede observar, el porcentaje de *outliers* de Snf7 y de los modelos obtenidos mediante RaptorX fueron similares.

2.2 Comparación estructural de modelos

A través de esta estrategia de modelado que prescinde de un templado de PDB, se obtuvieron modelos estructurales de Vps32 de *T. brucei* y *T. cruzi* en los cuales se reconocieron cinco hélices α , tal cual había sido determinado por el análisis bioinformático de estructura secundaria (**FIGURA 1 y FIGURA 5 de Búsqueda y detección de genes Vps32**). Tal como ha sido mencionado, la estructura cristalográfica de Snf7 reveló que las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$, en realidad, conformaban una única hélice (Tang et al., 2015) (**FIGURA 2A**). Y aunque podría haberse modificado la nomenclatura de las mismas, los autores continuaron identificándolas como entidades independientes. Ya que se mantuvo la nomenclatura original y con el objetivo de simplificar nuestro análisis respecto a la comparación con la estructura Snf7, la hélice $\alpha 2$ de TbVps32 y TcVps32, que abarcaba las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de Snf7, fue denominada hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$. De la misma manera, la hélice $\alpha 3$ de TbVps32 y TcVps32 fue identificada como hélice $\alpha 4$, la hélice $\alpha 4$ como hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 5$ como hélice $\alpha 6$ (**FIGURA 4**).

Ya realizada esta aclaración, hacia la NTR de TcVps32 y TbVps32, se distinguieron dos hélices: $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$; y hacia el CTR se reconocieron tres hélices: $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$. Además, se detectó la región *Linker* C-terminal, que en este capítulo fue identificada como *Linker 2*, y que une la hélice $\alpha 5$ a la hélice $\alpha 6$; así como una extensa NTR sin estructura periódica que, presumiblemente, podría abarcar el ANCHR.

2.2.1 Análisis comparativo de las regiones terminales CTR y NTR

A simple vista y de manera global, los modelos de TcVps32 y TbVps32 demostraron que ambas regiones terminales, NTR y CTR, presentaban distinta disposición espacial; es decir, una relación más estrecha entre las hélices de la NTR respecto a las hélices de la CTR. Con el objetivo de evaluar este comportamiento y determinar si el mismo se repetía en Snf7, se procedió a generar su modelo estructural completo mediante RaptorX. Incluir el modelado estructural completo de Snf7 en el análisis permitía evaluar el comportamiento distintivo de las regiones terminales (NTR y CTR) y su disposición espacial, como también conocer la disposición espacial

de las hélices y del *Linker* 2. En definitiva, esta información sería útil para el análisis comparativo con los modelos estructurales completos generados para TbVps32 y TcVps32.

El modelo obtenido para Snf7 mediante esta estrategia, se observa en la **FIGURA 6**, el cual fue sujeto a validación a través de la determinación del porcentaje de los residuos de la región *outliers* (**2.1.1 Validación de modelos**) y mediante su superposición con el modelo cristalográfico de Snf7 (PDB 5FD7 *Conformation A*) (**FIGURA 6C**).

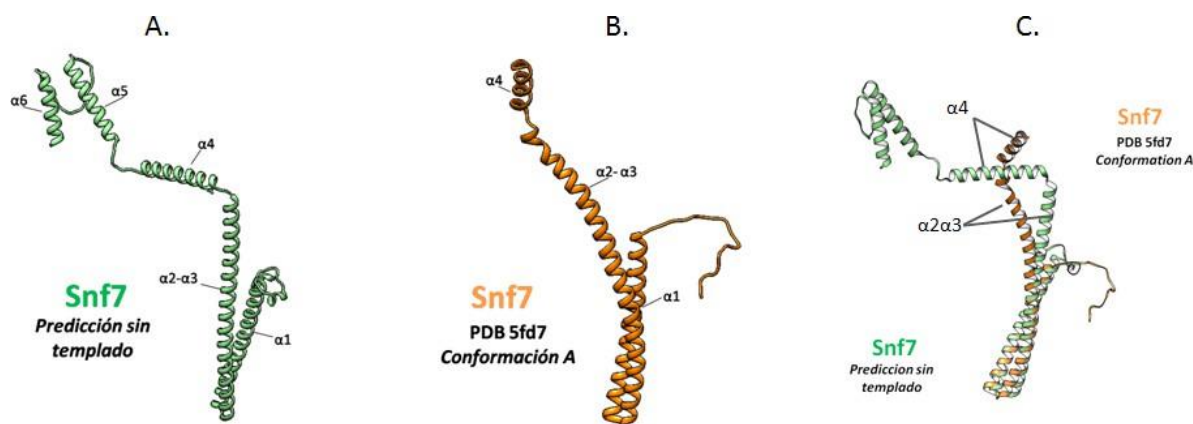


FIGURA 6. **A.** Modelo estructural completo de Snf7 obtenido mediante RAPTORX (**verde**) **B.** Estructura cristalográfica de Snf7 (PDB 5FD7 *Conformación A*) (**naranja**). **C.** Superposición estructural de los modelos dinámicos generados para Snf7 y Snf7 PDB (superposición de A y B).

La superposición de Snf7 y Snf7 PDB demostró la identidad estructural existente entre ambos modelos, ya que la superposición de las hélices $\alpha 1$ y la primera porción de las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ fue completa, presentando, además, la misma disposición espacial. Asimismo, se pudo apreciar la distinta disposición espacial de las regiones terminales: la NTR de apariencia más compacta y una CTR con un comportamiento más libre. Dado que entre el modelo Snf7 y la estructura Snf7 reportada en el PDB se observó una diferencia en la disposición espacial de la porción final de las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (**FIGURA 6**), confirmamos que la misma se correspondía específicamente a la hélice $\alpha 3$, mediante alineamientos de secuencia y análisis de estructura secundaria (**FIGURA 3**).

Ya contando con los modelos estructurales completos, es decir, modelos que incluían las hélices de la CTR, se procedió a la comparación de las regiones terminales -CTR y NTR- de los modelos completos de TcVps32, TbVps32 y Snf7. Para tal fin, el modelo Snf7 fue superpuesto con el modelo generado para TbVps32 y, asimismo, se llevó a cabo la superposición entre Snf7 y TcVps32 (**FIGURA 7**).

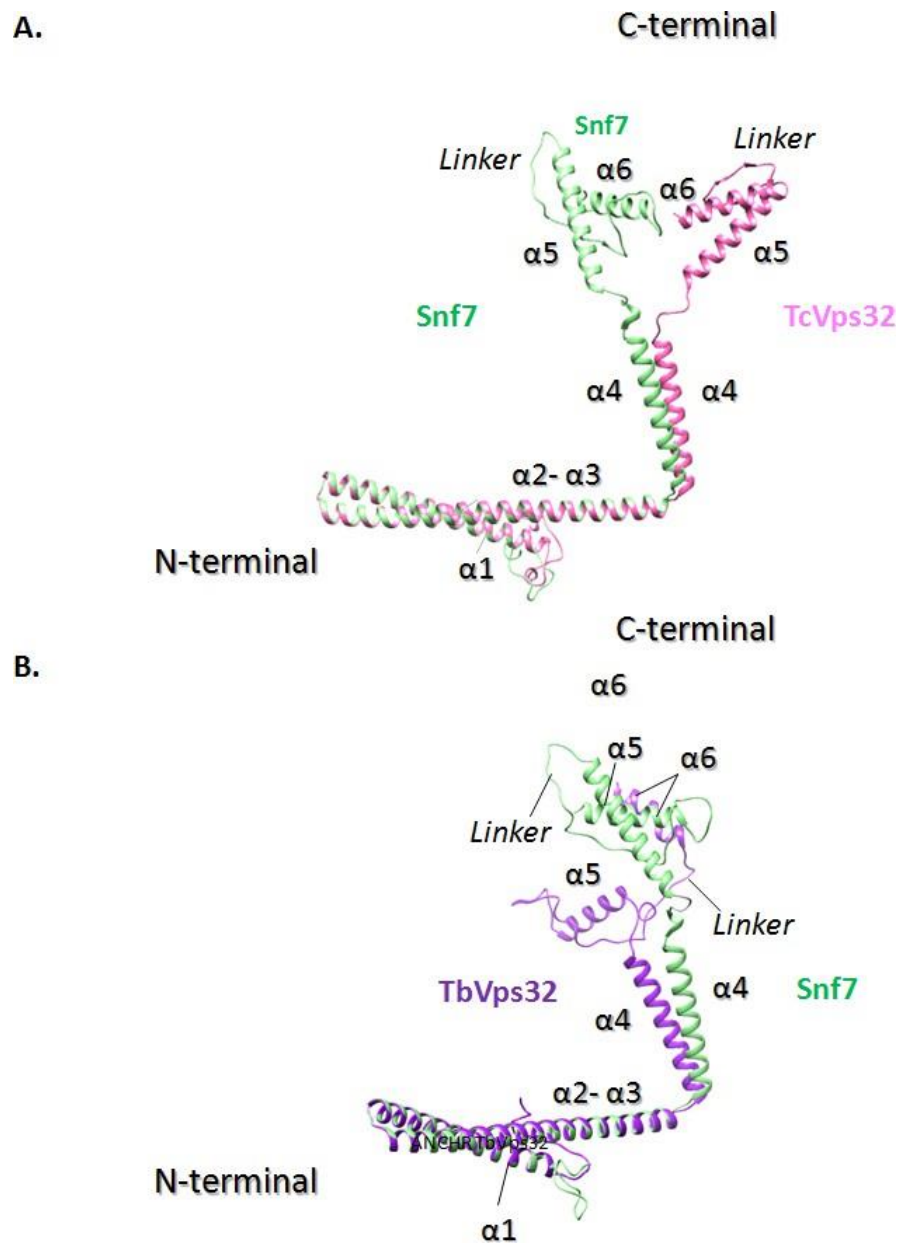


FIGURA 7. Comparación estructural entre Snf7 de *S. cerevisiae* y Vps32 de *T. brucei* y *T. cruzi*. **A.** Los modelos estructurales de Snf7 (verde) y TcVps32 (rosa) fueron superpuestos. **B.** Superposición del modelo Snf7 (verde) y TbVps32 (violeta). Todos los modelos fueron realizados con la herramienta de predicción de estructura RAPTORX sin templado, el cual se basa en generar un modelo tridimensional a partir de las características fisicoquímicas de los aminoácidos de cada una de las secuencias y de ciertos parámetros matemáticos (sección 1.1). Se puede observar la gran conservación de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2-\alpha 3$ de la NTR y la aparente divergencia estructural de la CTR, región reguladora de la proteína Vps32.

Hacia la NTR se evidenció una notable coincidencia estructural entre de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2-\alpha 3$

de TcVps32 y Snf7. El mismo comportamiento se observó entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de TbVps32 y Snf7 (**FIGURA 9B**). En este punto, fue significativo recordar la superposición de los modelos Snf7 (**FIGURA 6**). La completa superposición de las hélices NTR fue indicativo de la alta conservación estructural de esta región en TcVps32 y TbVps32 (**FIGURA 9A**).

Por el contrario, hacia la CTR se observaron las mayores diferencias estructurales entre modelos, ya que las hélices mostraron variaciones en su orientación espacial.

Debido a las diferencias observables entre regiones terminales, se procedió a evaluar dos conceptos importantes: desorden y flexibilidad. En general, una proteína naturalmente desordenada o una región desordenada puede ser flexible y, de hecho, puede contar con estructuras inestables en sus estados nativos; pero una proteína con regiones flexibles no siempre es desordenada. La importancia de la determinación del orden y la flexibilidad en TbVps32 y TcVps32 radicaba en la versatilidad conformacional descrita en Snf7, atribuida a las características estructurales y químicas de las regiones terminales. Resultaba probable que la versatilidad estructural pueda deberse a regiones flexibles y/o regiones desordenadas dentro de la proteína. Además de evidenciar el comportamiento dinámico de la CTR, nuestra presunción de la presencia de regiones flexibles y/o desordenadas se sustentó en la cristalización de Snf7: la ausencia estructural del extremo N-terminal y de toda la CTR. Al respecto, se ha reportado que ciertas proteínas o regiones desordenadas son habitualmente difícilmente cristalizables justamente por la ausencia del orden cristalográfico necesario (Pauwels et al., 2017). Por tanto, con la finalidad de entender las dinámicas hasta aquí analizadas, procedimos a evaluar la flexibilidad de las distintas regiones de cada una de las proteínas.

Para determinar el grado de movilidad de cada aminoácido en cada región de la proteína utilizamos la herramienta CABSflex (<http://212.87.3.12/CABSflex2/submit>), siempre teniendo en cuenta que el grado de flexibilidad podría relacionarse al grado de movilidad de cada aminoácido. Esta herramienta nos permitió obtener un gráfico general de Fluctuaciones (*Fluctuation Plot*) para cada modelo. El gráfico de RMSF (*Root-Mean-Square-Fluctuation*) demuestra cuánto se mueve un aminoácido entre un tiempo y otro, o, dicho de otra manera, qué grado de movilidad tiene a lo largo de la dinámica. Asimismo, puede indicar estructuralmente qué aminoácidos en una proteína contribuyen más o menos a un movimiento molecular.

Hasta aquí, se había detectado la estrecha relación entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de todos los

modelos analizados, relación presumiblemente más estática y menos flexible (compacta) respecto a la CTR. Finalmente, nuestras observaciones fueron respaldadas por los resultados arrojados en el gráfico general de Fluctuaciones de CABSflex (**FIGURA 8**). Al superponer todos los modelos ensayados, se distinguieron tres regiones:

1. La primera región abarcó aproximadamente 25 aminoácidos hacia la NTR y representó una zona de mucha flexibilidad con valores oscilantes y altos de RMSF, muy superiores a 0 Å. En esta región se ubica el motivo ANCHR.
2. La segunda región de la NTR se extendió aproximadamente desde el aminoácido 25 al 90, con valores oscilantes y cercanos a 0 Å, lo cual indicaba que la zona era significativamente menos flexible que la zona anterior. En esta segunda región se ubicaron las hélices $\alpha 1$ y la primera mitad de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$.
3. Por último, la tercera región se situó hacia la CTR desde el aminoácido 90 en adelante, registrándose valores altos de RMSF. Por lo tanto, esta zona que abarcó la última porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$, la hélice $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$, presentó la mayor movilidad de los aminoácidos y, por lo tanto, mayor flexibilidad en todos los modelos.

Este análisis nos permitió inferir un comportamiento análogo de la NTR de todas las estructuras evaluadas, lo que, en suma, se sintetizó en la posible conservación funcional de dicha región, que comprende tanto el motivo ANCHR como las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$. Respecto a la CTR, tal como se esperaba, todos los modelos presentaron una gran flexibilidad coincidente con la funcionalidad regulatoria que se le adjudica a la región

En suma, los resultados arrojaron diferencias en el grado de flexibilidad estructural de las regiones, respaldando las observaciones sobre las distintas disposiciones espaciales de las NTR y CTR. Adicionalmente, en TcVps32 y TbVps32, estas regiones mantuvieron tanto el comportamiento conformacional como el grado de flexibilidad estructural observados en las dos variantes de Snf7 analizadas en este estudio.

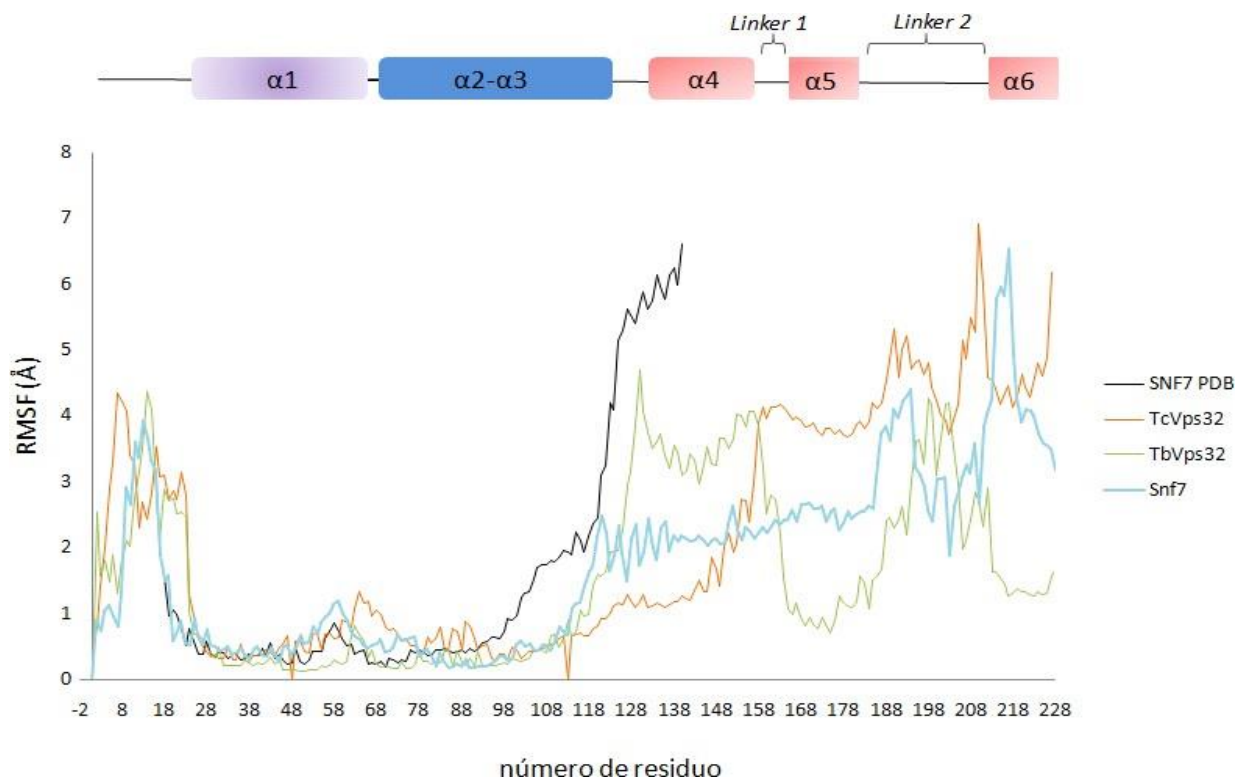


FIGURA 8. Flexibilidad de la estructura o fluctuaciones (*Fluctuation Plot*). A través de la herramienta CABSflex, se obtuvo un gráfico que relaciona a cada aminoácido con su grado de movilidad en un tiempo determinado. En todos los modelos ensayados, se reconocen tres regiones de distintos valores de flexibilidad. TcVps32 (línea naranja) y TbVps32 (línea verde) mantienen el mismo comportamiento que Snf7 (línea celeste) a lo largo de toda la estructura. Snf7 PDB posee el mismo comportamiento que la estructura Snf7 (línea celeste) en la NTR y sólo en la porción cristalizada de la CTR.

Aun no teniendo datos estructurales de la CTR de Snf7 PDB, pudo observarse que la flexibilidad de esta región fue ascendente a partir, aproximadamente, del aminoácido 100 (**FIGURA 8**).

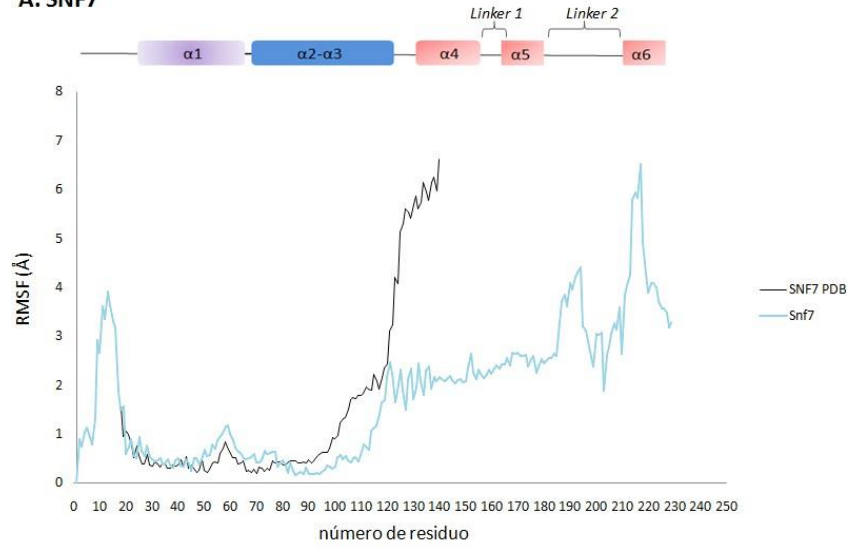
Esto podría sugerir que esta región podría presentar el mismo comportamiento flexible exhibido en los otros tres modelos. Por otro lado, lo que se evidenció con claridad, fue que la NTR, carente de estructura periódica y que englobaba el motivo ANCHR, presentó una flexibilidad similar a la de los modelos estudiados; es decir, a partir aproximadamente del aminoácido 18, la estructura obtenida por cristalografía mostró valores de RMSF superiores a 1 Å.

Al analizar por separado cada modelo (**FIGURA 9**), no sólo se pudo apreciar lo destacado a nivel global respecto a las tres regiones con distinto grado de flexibilidad, sino que, además, resultaron interesantes dos puntos:

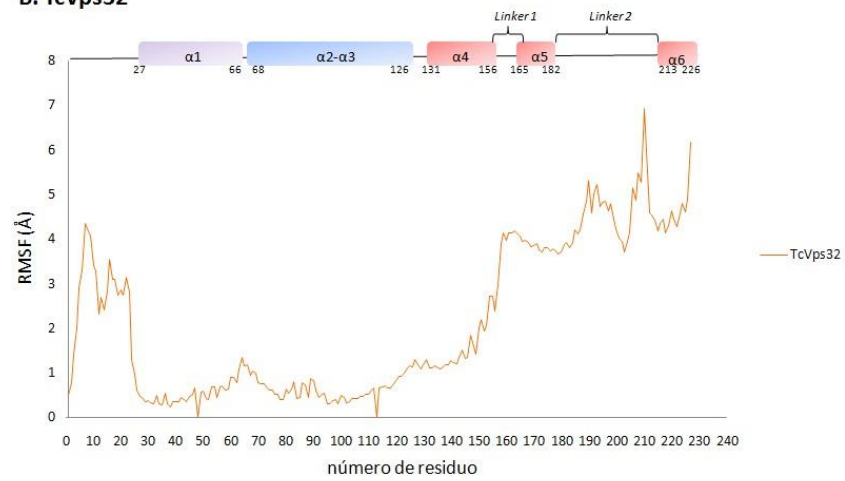
- 1- tanto en TcVps32 como en TbVps32 se repitió el comportamiento de la última porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de Snf7 y Snf7 PDB (**FIGURA 6**);
- 2- los valores de flexibilidad obtenidos para las regiones *Linker* de la CTR.

Respecto al primer punto, los valores de RMSF muy superiores a 0 Å, no hicieron más que confirmar la flexibilidad de la última porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$. Este comportamiento había sido muy evidente en la simulación de ambos modelos Snf7 (**FIGURA 6**). Notando estas diferencias en la última porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ y teniendo en cuenta que cada uno de los modelos propuestos fueron representativos del estado de la proteína en un determinado momento de una escala temporal, se generó la simulación de la dinámica de cada una de las estructuras aquí comparadas con el objetivo principal de visualizar los cambios de disposición espacial de la última porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (estrictamente $\alpha 3$). La dinámica estructural de cada modelo fue obtenida a través de la herramienta CABSflex, obteniéndose una estructura PDB que reflejaba la disposición de la proteína para un determinado momento o tiempo (**FIGURA 10 Y FIGURA 11**). Asimismo, a través de CABSflex fue generado el gráfico *Fluctuation Plot* para cada estructura PDB de la dinámica de TcVps32 y TbVps32 para evaluar los cambios de movilidad o flexibilidad de las regiones y hélices en su conjunto (**FIGURA 15**). Esto será abordado más adelante en este capítulo.

A. SNF7



B. TcVps32



C. TbVps32

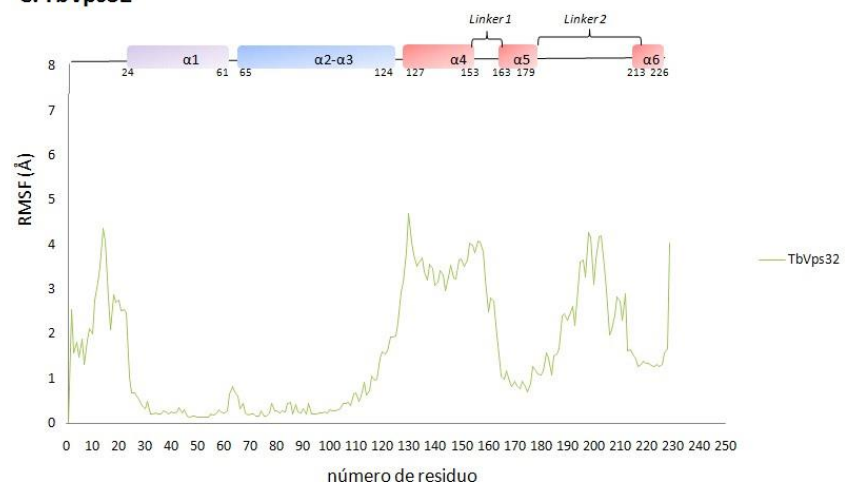


FIGURA 9. Fluctuaciones (*Fluctuation Plot*). Cada gráfico representa el cálculo de la movilidad (RMSF) para cada aminoácido, entre un tiempo y otro, para cada estructura. Las hélices α_4 , α_5 y α_6 del CTR

presentan el mayor grado de movilidad, sin embargo, es destacable la flexibilidad exhibida por las regiones *Linker 1* y *Linker 2*. **A.** Modelo cristalográfico de Snf7 (PDB 5FD7) y modelo de estructura completa de Snf7 (obtenido mediante *RaptorX sin templado*). **B.** Modelo de estructura completa de TcVps32 de *T. cruzi* y **C.** Estructura completa de TbVps32 de *T. brucei*.

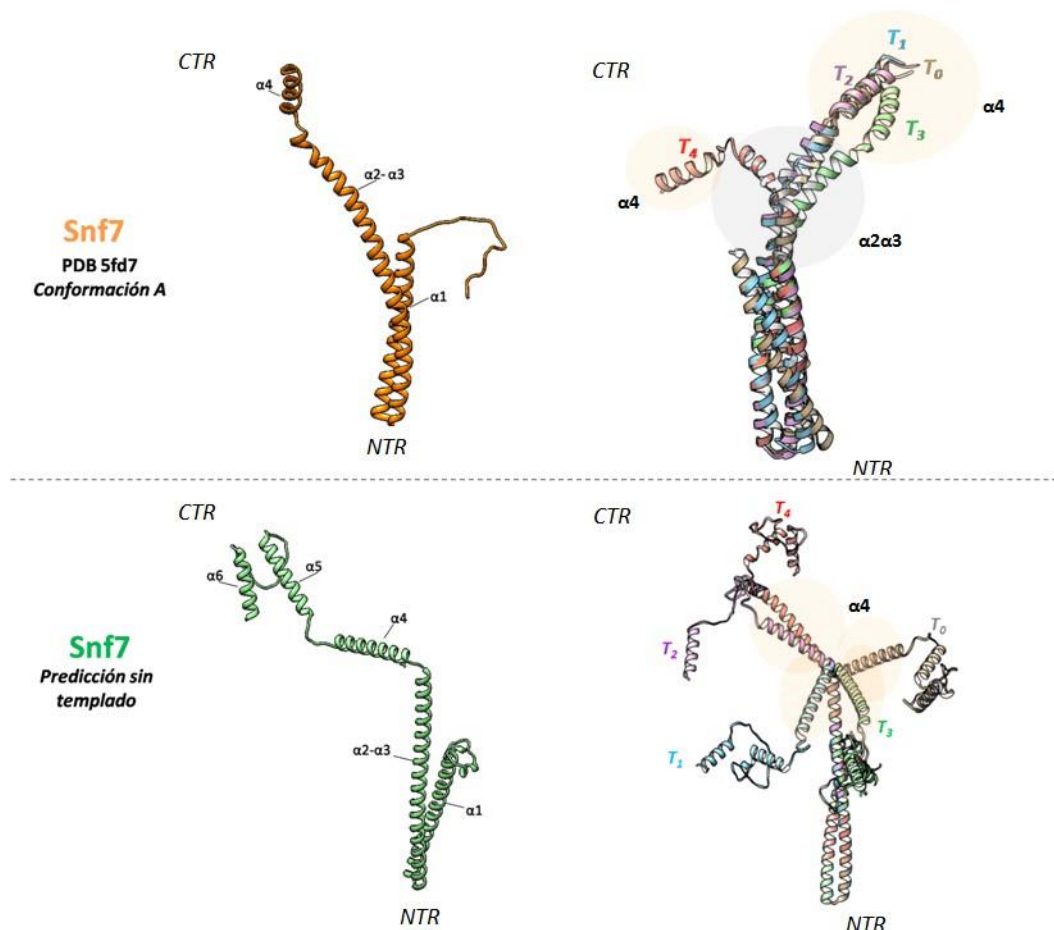


FIGURA 10. Modelos dinámicos de Snf7 PBD y Snf7 sin templado. A través de *CABSflex* se realizó la dinámica de ambas estructuras de Snf7 con el objetivo de evaluar el comportamiento de la última porción de la hélice $\alpha 2\text{-}\alpha 3$ (zona gris). La simulación permitió generar distintos modelos con su PDB en función del tiempo (T_1 , T_2 , T_3 y T_4). Se puede observar cómo las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2\text{-}\alpha 3$ (NRT) parecen mantener su posición a lo largo del tiempo, mientras que las hélices de la CTR cambian de posición. En las dinámicas se puede observar cómo va cambiando la disposición espacial de la hélice $\alpha 4$ (zona naranja) de una manera muy notable respecto al comportamiento estático de las hélices que conforman la NTR.

En la **FIGURA 10** se observa la superposición de cada una de las dinámicas de los modelos de Snf7, cristalográfico, por un lado, y sin templado por el otro (**FIGURA 10**). En ambos modelos se puede evidenciar el análogo comportamiento de las regiones terminales. Por un lado, se observaron cambios mínimos de posición a lo largo de la dinámica de la NTR y por otro, se

observaron significativos cambios de posición de la CTR a lo largo de la dinámica.

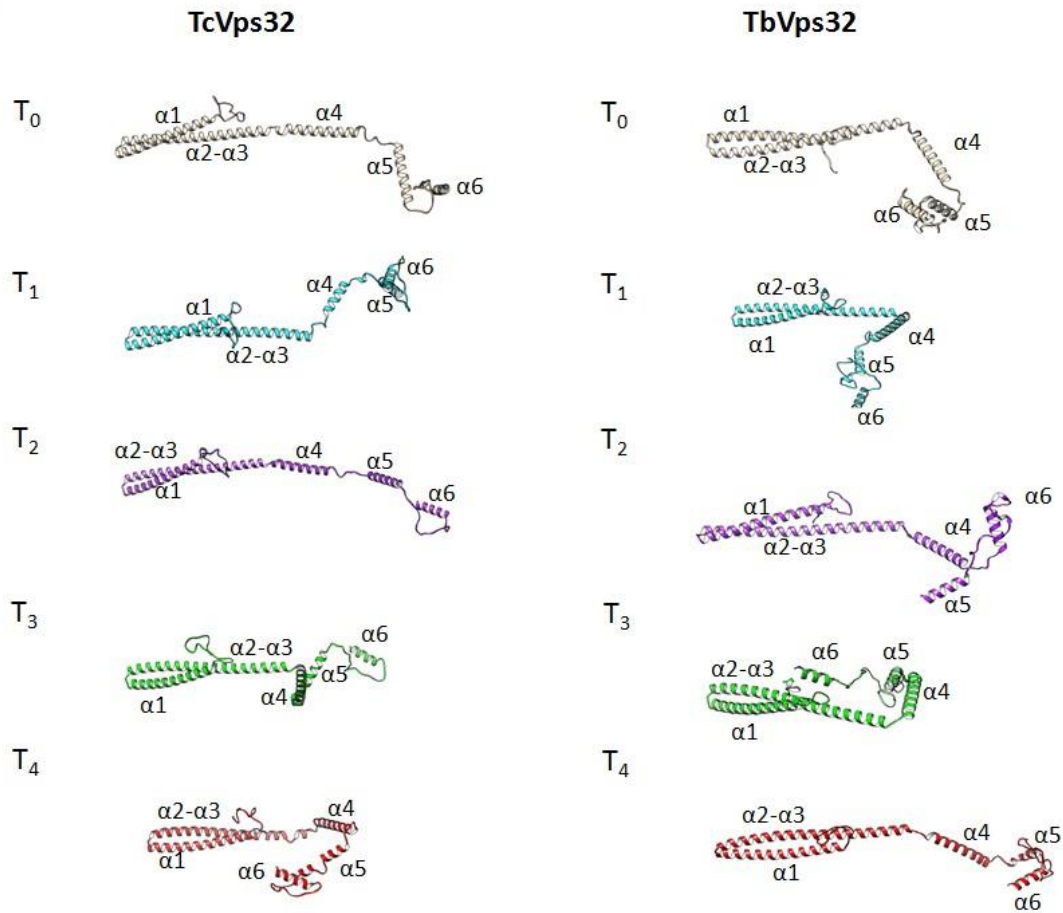
Concretamente respecto a la NTR, su comportamiento casi estático a lo largo de las dinámicas demostró la superposición completa de las hélices $\alpha 1$ y de la primera porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (que, en términos estrictos, se correspondió con la hélice $\alpha 2$). Esto coincidió con lo obtenido previamente al superponer ambos modelos Snf7 (**FIGURA 6**).

Al observar la dinámica de TbVps32 y TcVps32 mediante *CABSflex* (**FIGURA 11**), se pudo observar nuevamente que, de manera global, ambos modelos repetían el comportamiento de la CTR (hélices $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$), cambiando su disposición espacial en función del tiempo a partir de la hélice $\alpha 4$. Por el contrario, las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de la NTR, sufrían cambios mínimos de posición a lo largo de la dinámica. Por consiguiente, la CTR guardaba un comportamiento más dinámico o de mayor movimiento respecto al comportamiento más compacto y rígido observado entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de la NTR.

En los modelos dinámicos de TcVps32 y TbVps32 también se evidenció la superposición de las hélices $\alpha 1$ y la primera porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ a lo largo de las dinámicas (**FIGURA 11**) y, de hecho, los cambios de ubicación espacial en función del tiempo para todos los modelos se observaron a partir de la última región de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (que se corresponde con la hélice $\alpha 3$). Esto se pudo apreciar de manera evidente al evaluar el gráfico *Fluctuation Plot* de las dinámicas de TcVps32 y TbVps32 (**FIGURA 15**).

Si bien de manera global, toda la CTR exhibió valores de RMSF significativos que demostraron su gran flexibilidad (**FIGURA 9**), fueron curiosos los valores registrados para la hélice $\alpha 4$, ya que se observó como una zona de significativa flexibilidad ubicada inmediatamente después de una zona de flexibilidad prácticamente nula (como lo es la NTR). Esto se aprecia con mayor claridad al observar las dinámicas de TcVps32 y TbVps32, ya que la hélice $\alpha 4$ cambia su disposición espacial a lo largo del tiempo mientras la NTR permanece casi inalterable (**FIGURA 11**).

A.



B.

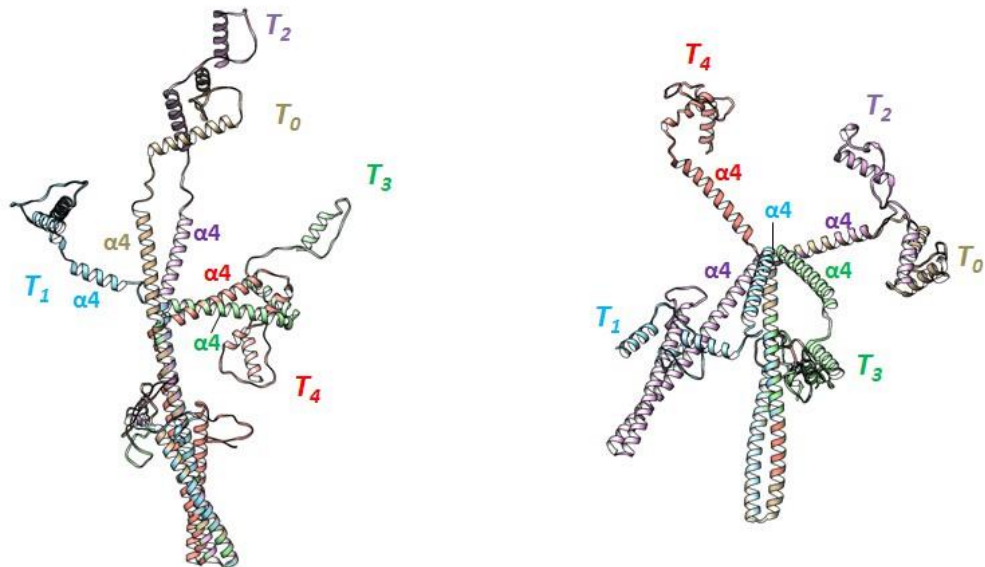


FIGURA 11. Modelos dinámicos generados para TcVps32 y TbVps32. A. La simulación permitió generar distintos modelos con su PDB en función del tiempo. Se puede observar cómo las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2-\alpha 3$ (NTR) parecen mantener su posición a lo largo del tiempo, mientras que las hélices $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$ cambian de posición. De esta manera, es notable la mayor flexibilidad de la región CTR respecto a la

NTR. **B. Superposición estructural de los modelos dinámicos.** Es notable la disposición que adquiere la hélice α_4 en Vps32 a lo largo del tiempo. La flexibilidad de esta zona de la proteína podría contribuir a la dinámica que se observa sobre el CTR.

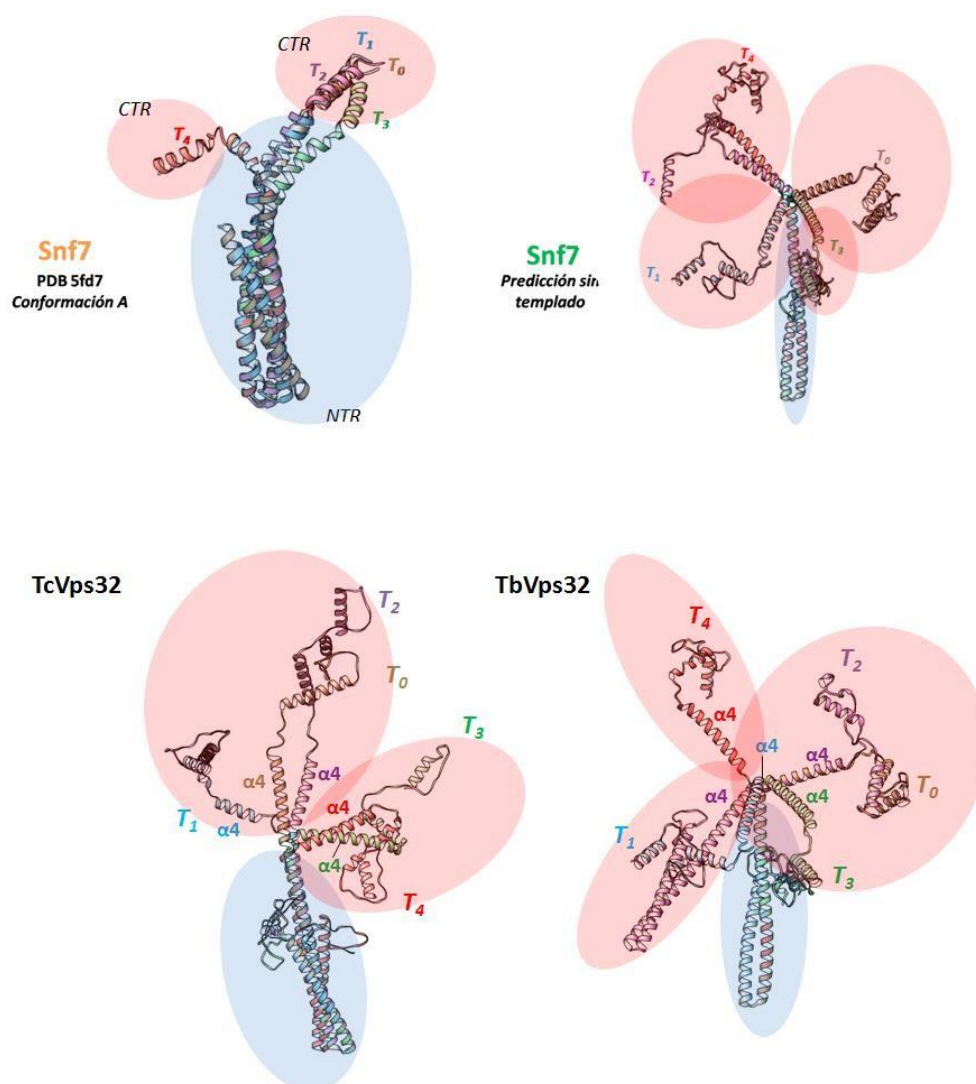


FIGURA 12. Comportamiento diferencial de las regiones terminales, NTR y CTR. A través de las dinámicas de cada una de las estructuras se puede observar las distintas posiciones espaciales que ocupa la CTR (rojo) producto de su gran flexibilidad. Por el contrario, la NTR (azul) mantiene su misma posición a lo largo de las dinámicas lo cual coincide con los resultados de flexibilidad exhibidos.

De manera que, en suma, a través del análisis de las dinámicas no sólo pudimos validar nuevamente el modelo estructural completo para Snf7 (abordado a través de la utilización de la herramienta *RaptorX* sin templado PDB), sino que pudimos detectar un comportamiento particular a partir de la última porción de la hélice α_2 - α_3 en todos los modelos, el cual impacta directamente sobre la CTR. Es a partir de la última porción de la hélice α_2 - α_3 donde ocurren

los cambios de disposición espacial fácilmente perceptibles de la CTR en conjunto. El aumento progresivo de flexibilidad en la última porción de $\alpha 2$ - $\alpha 3$ parece propiciar la dinámica de la CTR y, específicamente, acompañar el movimiento de la hélice $\alpha 4$. Si bien los cambios dinámicos de la CTR en función del tiempo se percibieron con mayor claridad a partir de la hélice $\alpha 4$, para que se perciba un cambio significativo de la CTR, más allá de la alta flexibilidad intrínseca de la hélice $\alpha 4$, se necesita de una región previa también flexible que acompañe el movimiento. Este podría ser el rol de la última porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$.

En conclusión, a partir del primer punto analizado se constató que las regiones terminales presentaron un comportamiento diferencial, atribuible a su distinta flexibilidad estructural. En la **FIGURA 12**, se observa sintéticamente lo percibido según nuestros resultados: una NTR rígida a lo largo de las dinámicas y una CTR muy flexible y dinámico. Por otro lado, a partir de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ comienzan a hacerse evidentes los cambios de flexibilidad de las regiones terminales, los cuales se hicieron evidentes a partir de la hélice $\alpha 4$.

En relación con el segundo punto, referido a las regiones *Linker*, se destacó el comportamiento de *Linker 2* y *Linker 1* de la CTR. En la literatura sólo se ha descrito a la región *Linker*, como aquella que conecta la última (hélice $\alpha 6$) y anteúltima hélice (hélice $\alpha 5$) a la de Vps32. La distinción aquí establecida como *Linker 1* o *Linker 2* surgió de los resultados obtenidos y se aplicó con fines prácticos, a fin de describir los comportamientos observados en estas estructuras conectoras. A saber, el *Linker 1* conectó las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$; mientras que, el *Linker 2* unió la hélice $\alpha 5$ a la hélice $\alpha 6$, constituyendo la región regulable por la ATPasa Vps4, como ha sido descrito por varios autores. En la **FIGURA 8 y 9**, se observa el comportamiento de las regiones *Linker 1* y *Linker 2*, los cuales presentaron valores elevados de RMSF y en forma de picos; es decir, los valores ascendían y descendían drásticamente con máximos y mínimos, lo cual fue indicativo de su gran flexibilidad y dinamismo. Nuestra suposición fue que ambos comportamientos no constituían eventos arbitrarios, sino que respondían a la lógica funcional de cada una de las regiones. Esto se profundizará al continuar con la evaluación completa de la estructura.

Con el objetivo de determinar si las regiones flexibles eran, además, desordenadas, estudiamos este comportamiento en TcVps32 y TbVps32. Para tal fin, fue utilizado el servidor *Protein DisOrder Prediction System* (PrDOS, <http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>) (Ishida & Kinoshita, 2007), el cual permite establecer el grado de desorden de cada uno de los aminoácidos que compone la secuencia proteica. Los predictores de desorden poseen una gran variedad de métodos alternativos de cálculo, pero en general utilizan dos características generales de este tipo de regiones, como son, la alta frecuencia de residuos hidrofílicos y cargados, y la baja complejidad en la secuencia (Ishida & Kinoshita, 2007). PrDOS expresa el resultado de manera gráfica como la probabilidad de desorden de cada residuo a lo largo de la secuencia, de manera que, se puede observar el comportamiento global y de cada región de la proteína. El programa establece 0.5 Å como valor umbral y, por lo tanto, los aminoácidos cuyos valores superen ese valor, se consideran desordenados (**FIGURA 13**).

En TbVps32 y TcVps32 se pudo observar que la mayor probabilidad de desorden se centró en los primeros 22 aminoácidos de la NTR, final de la hélice $\alpha 5$, *Linker 2* y hélice $\alpha 6$ de la CTR. Entonces, en estas regiones de la NTR y CTR, teniendo en cuenta estos resultados y los resultados previos de flexibilidad de los aminoácidos (**Gráfico de Fluctuaciones de la FIGURA 8**), el grado de desorden se relacionó con la flexibilidad.

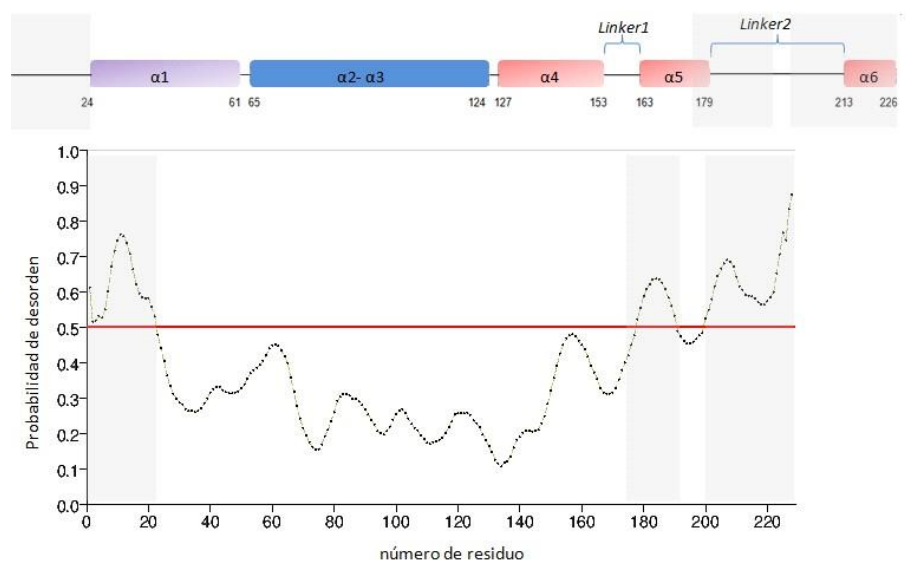
Por otro, el mayor orden se percibió en las hélices $\alpha 1$ y la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$, ya que los valores se encontraron por debajo de 0.5Å. Entonces, para estas mismas áreas, se registró el mayor grado de rigidez y orden. Por lo tanto, la NTR constituye una región desordenada (**FIGURA 13**) y flexible (**FIGURA 8**), lo cual es compatible con las funciones que lleva a cabo esta región como dominio de anclaje a las membranas (ANCHR).

Además, respecto a la NTR de Snf7 (PDB 5FD7), por comparación con los modelos estructurales de TcVps32 y TbVps3, se pudo inferir que la región comprendida por los primeros 18 aminoácidos podría presentar tendencia al desorden. Ya que los primeros cinco aminoácidos de la NTR suelen no encontrarse empaquetados y suelen ser regiones desordenadas, nuestra presunción podría ser válida desde este punto. Por tanto, la ausencia

de resolución cristalográfica de la NTR de Snf7 podría ser consecuencia del desorden y la flexibilidad que caracteriza a la región.

Hacia la CTR, según el gráfico referido a la probabilidad de desorden (**FIGURA 13**), la hélice $\alpha 4$ resultó ser ordenada; sin embargo, los resultados de movilidad de los aminoácidos (*Fluctuation plot*), arrojaron que se trataba de una hélice flexible. En otras palabras, la hélice $\alpha 4$ presentó un comportamiento distintivo: a diferencia de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de la NTR, que se mantenían ordenadas y rígidas, y de las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$, caracterizadas por su desorden y flexibilidad, la hélice $\alpha 4$ exhibía un comportamiento ordenado y flexible. Estas características podrían sustentar su disposición particular respecto de los extremos (**FIGURAS 10 y 11**), dado que, en ambos tripanosomátidos, esta hélice aparentaba desempeñar un papel de nexo estructural entre la CTR y la NTR, orientando a cada región terminal en direcciones opuestas a partir de su eje (**FIGURA 14**).

TbVps32



TcVps32

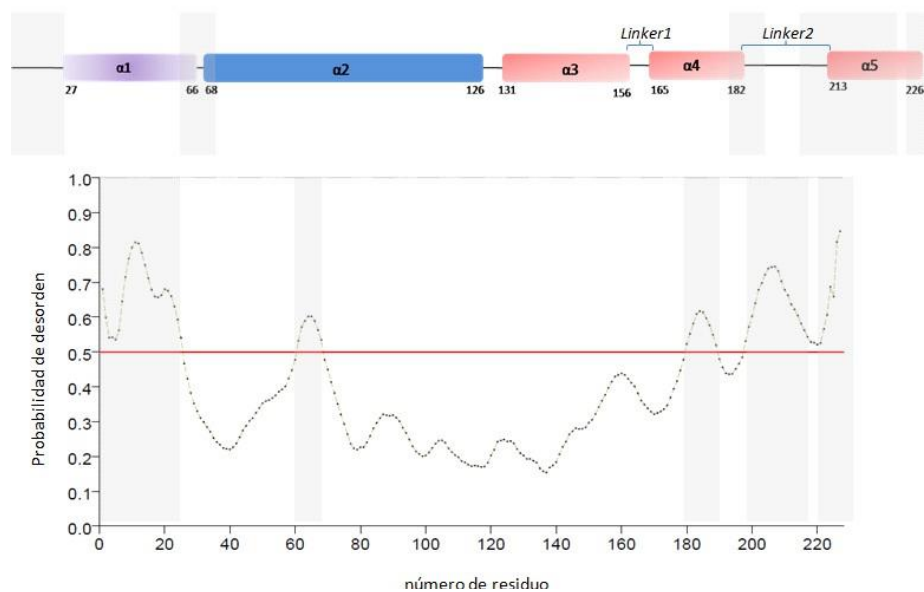


FIGURA 13. Probabilidad de desorden. A través de la herramienta *PrDOS* (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>), se calculó la probabilidad de desorden de cada uno de los aminoácidos que compone cada región de la proteína.

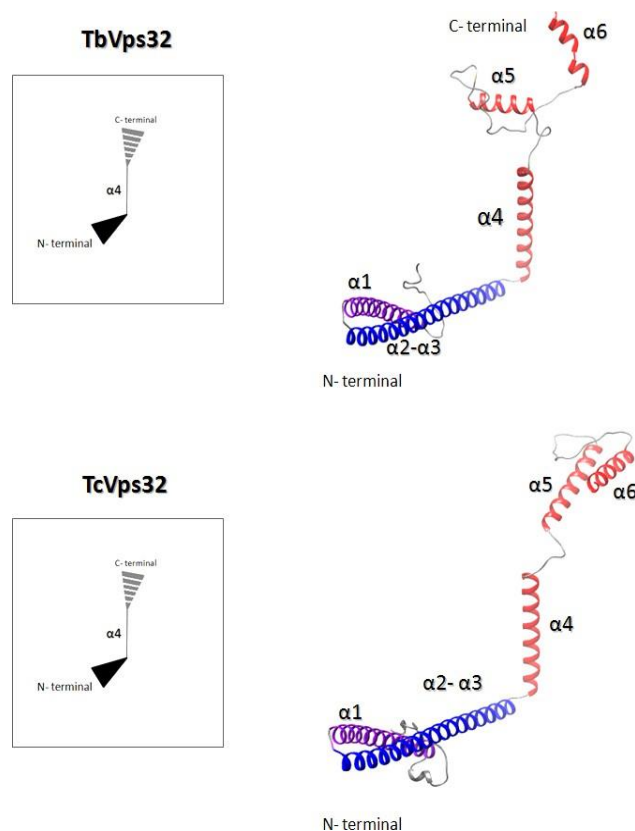


FIGURA 14. Disposición espacial de la CTR Y NTR en relación con la hélice $\alpha 4$ de TbVps32 y TcVps32 (conformación abierta). Los modelos estructurales obtenidos mediante RAPTORX nos permitieron evaluar la disposición espacial de la hélice $\alpha 4$. Teniendo como eje principal la Hélice $\alpha 4$, se puede observar que las NTR y CTR se disponen en orientaciones contrarias entre sí y a un lado entorno a la hélice $\alpha 4$. De esta manera, dicha hélice podría actuar como centro organizador de la disposición espacial NTR y CTR de ambas proteínas y, por lo tanto, de sus cambios conformacionales.

En cuanto a la relación entre la hélice $\alpha 4$ y las hélices de la NTR, se ha reportado que, durante las variaciones conformacionales de Snf7, la hélice $\alpha 4$ modifica su ángulo de orientación con respecto a las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (Tang et al., 2015). Teniendo en cuenta los resultados hasta aquí obtenidos, los hallazgos de los autores podrían extenderse a lo observado en TbVps32 y TcVps32.

Con el objetivo de evaluar los movimientos de estas hélices a lo largo de las dinámicas y la relación de la hélice $\alpha 4$ con los extremos, se analizó el grado de flexibilidad (*Fluctuation Plot*) de cada estructura PDB representativo de un tiempo (T_0 , T_1 , T_2 y T_3) dentro de la dinámica de

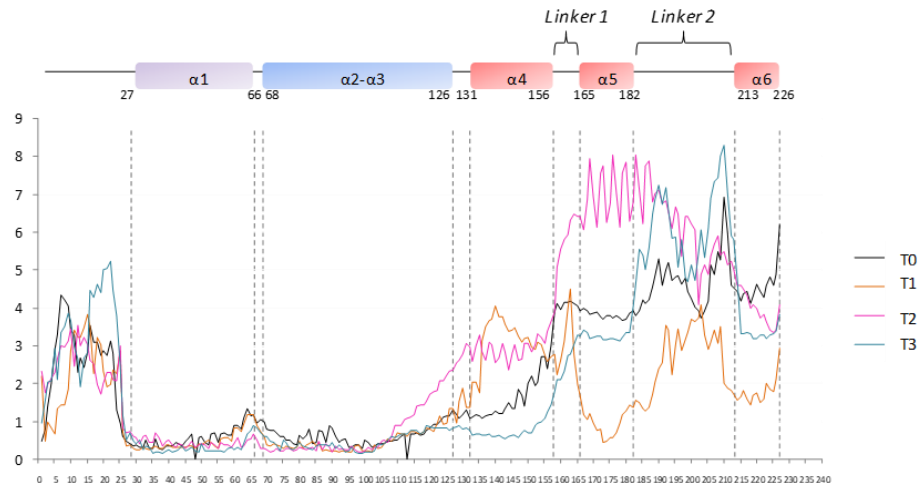
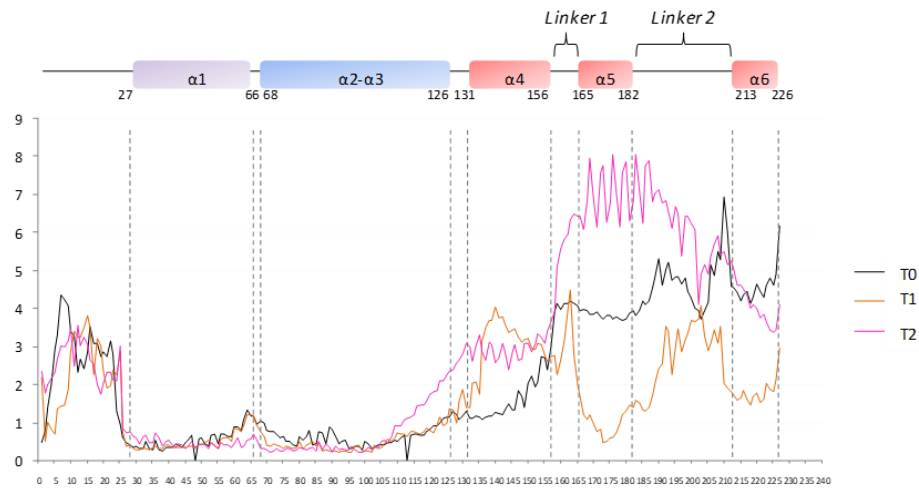
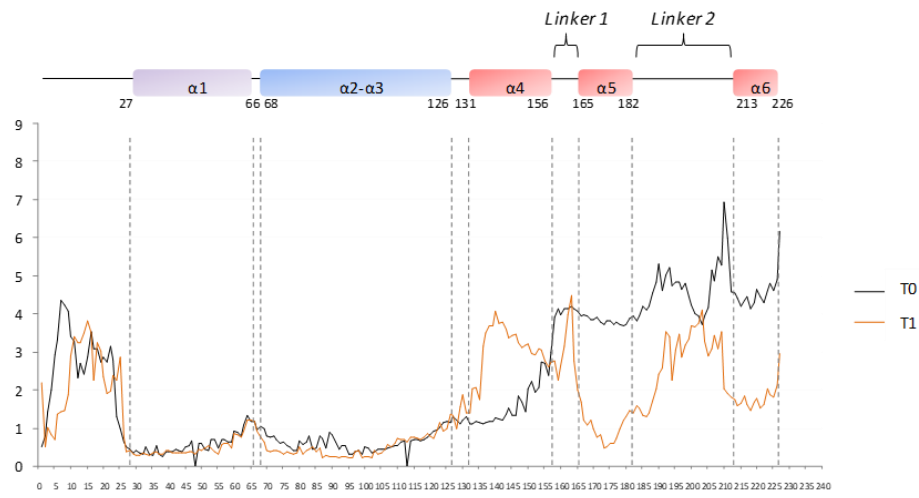
TbVps32 y TcVps32 mediante *CABSflex* (**FIGURA 15**).

Los gráficos obtenidos para TcVps32 demostraron que el extremo NTR, que contiene el ANCHR, mantuvo su flexibilidad a lo largo de la dinámica. Por su parte, las hélices $\alpha 1$ y la primera mitad de $\alpha 2$ - $\alpha 3$ mantuvieron sus bajos valores de RMSF, por lo que los cambios de flexibilidad a lo largo de las dinámicas resultaron moderados. Al observar la dinámica completa, los cambios en la movilidad de los aminoácidos, y, por lo tanto, la mayor flexibilidad, comenzaron a evidenciarse a partir de la última porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$. Tales movimientos simulaban “acompañar” el movimiento de la hélice $\alpha 4$, lo cual fue más evidente comparando las dinámicas T_0 , T_1 y T_2 . Por su parte, la hélice $\alpha 4$ cambió su flexibilidad a lo largo de toda la dinámica, tal como se pudo apreciar comparando las dinámicas desde T_0 a T_3 .

Continuando hacia la CTR, las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ modificaron sustancialmente su flexibilidad entre dinámica y dinámica (**FIGURA 15**). Tal como se ha señalado anteriormente, las regiones *Linker 1* y *Linker 2* hacia la CTR, representaban globalmente dos regiones de flexibilidad variable, pero siempre presentando valores altos de RMSF. En estas regiones se evidenció el aumento y descenso de la flexibilidad generando una contribución aparente con los movimientos de las hélices de la CTR. Cabe recordar que, según nuestros resultados, mientras el *Linker 1* se correspondía con una región más ordenada, el *Linker 2* se caracterizó por ser desordenado y flexible, por lo que ambas regiones podrían cumplir distintas funciones durante las dinámicas. Debido a que el *Linker 2*, constituye la región modulada por la ATPasa Vps4, es probable que el desorden y la flexibilidad de esta región sean los atributos que le permiten a Vps32 llevar a cabo los cambios conformacionales.

Por su parte, en el *Linker 1*, las variaciones numéricas de flexibilidad fueron significativas entre una dinámica y otra. De una u otra manera, como se ha destacado previamente, es evidente que existe una lógica estructural del comportamiento de estas regiones sin estructura periódica para la CTR.

A. TcVps32



B. TbVps32

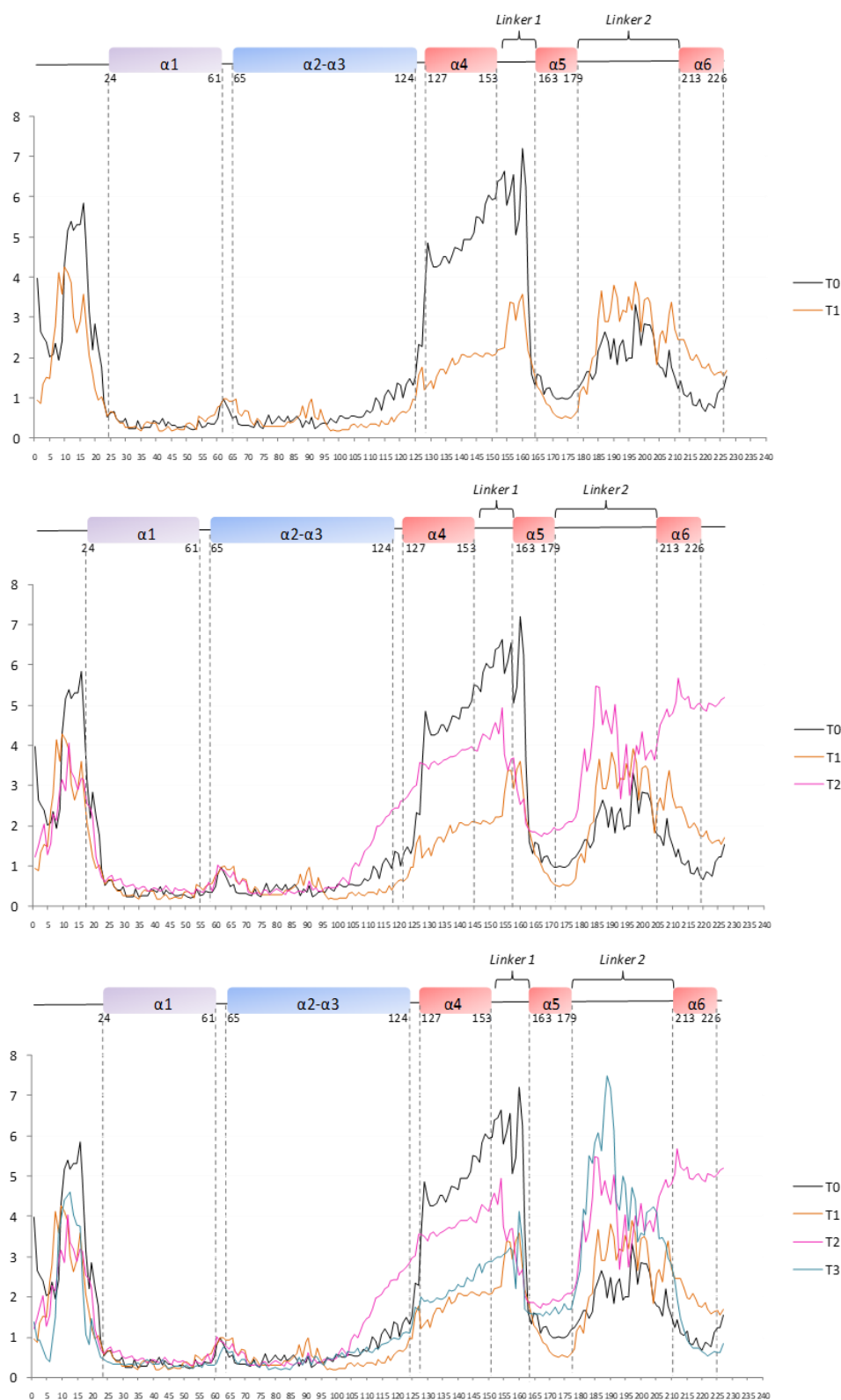


FIGURA 15. *Fluctuation Plot* de cada PDB (T_0 , T_1 , T_2 y T_3) de la dinámica de TbVps32 y TcVps32. Al

realizar la dinámica de las estructuras, se obtuvo un PDB representativo de cada momento o tiempo determinado (T_0 , T_1 , T_2 y T_3). Cada uno de estos PDB fue insertado en *CABSflex* para calcular la movilidad de los aminoácidos y generar un gráfico de flexibilidad de la estructura. Cada gráfico representa el cálculo de la movilidad (RMSF) para cada aminoácido, entre un tiempo y otro, para cada estructura. Se pueden apreciar los cambios de flexibilidad de las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ que podrían acompañar los cambios notables de flexibilidad de la hélice $\alpha 4$.

En línea con los movimientos que realiza la hélice $\alpha 4$, en Snf7 se ha reportado que los cambios respecto a los ángulos de torsión entre las hélices $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ y $\alpha 4$ se suscitan cuando la hélice $\alpha 2$ interactúa con la hélice $\alpha 4$ estableciéndose, entonces, el estado cerrado o inactivo de la proteína (Tang et al., 2015) (**FIGURA 16**). Debido a que hasta el momento no ha sido posible obtener una estructura cristalográfica de Snf7 en su conformación cerrada, este mecanismo fue dilucidado por los autores a través de una simulación mediante un *software*. A través de esta estrategia, se evaluó la interacción entre ciertos aminoácidos específicos de la hélice $\alpha 4$ y la hélice $\alpha 2$ (Buchkovich et al., 2013). En esta interacción se reconoció la participación de los aminoácidos Gln90 ($\alpha 2$) y Met130 ($\alpha 4$) que se encuentran próximos entre sí durante la conformación cerrada de Snf7. Teniendo en cuenta la conservación de estos residuos en *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *M. mulatta* y *M. musculus*, se llevó a cabo la búsqueda de los mismos en TbVps32 y TcVps32 mediante Clustal Omega.

El resultado del análisis de secuencia múltiple realizado detectó la presencia de Met135 de la hélice $\alpha 4$ de TbVps32 y Met138 de TcVps32, mientras que en las hélices $\alpha 2$ no se encontraron aminoácido polares, sino por el contrario, se encontraron residuos no polares: Leu95 en TbVps32 y Leu98 en TcVps32. Debido a que las interacciones entre aminoácidos se analizan a partir de modelos estructurales en su conformación cerrada, nos fue dificultoso aseverar o descartar la posibilidad de las interacciones entre las hélices mencionadas en TbVps32 y TcVps32 a través de dichos aminoácidos. Sin embargo, podría ser indicativo de la existencia de un mecanismo de interacción similar entre hélices durante los cambios conformacionales.

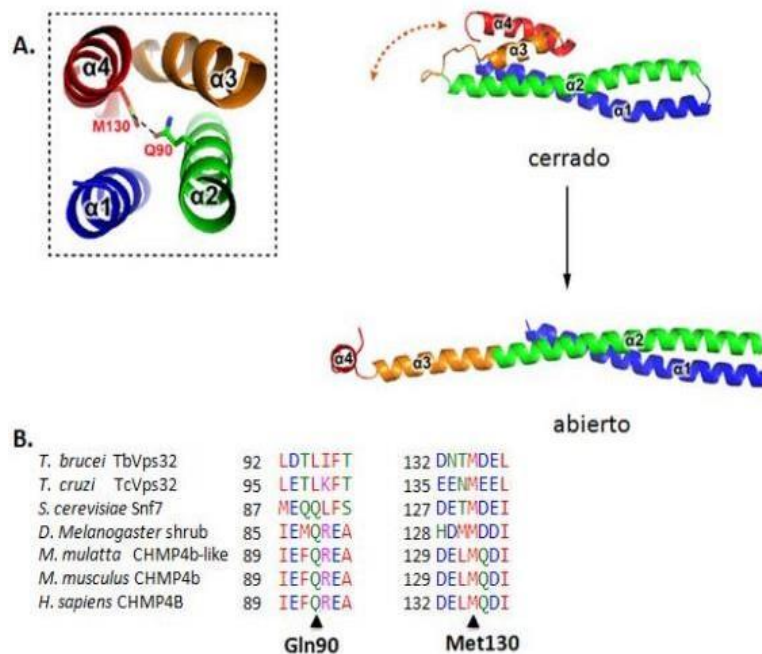


FIGURA 16. Hélices de la región N- terminal y los cambios conformacionales. **A.** Modelo propuesto para la conformación inactiva o cerrada de Snf7 de *S. cerevisiae* en la cual interactúan las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 4$ a través de las cadenas laterales de los aminoácidos Met130 ($\alpha 4$) y Gln90 ($\alpha 2$) (Tang et al., 2015). **B.** Resultado del alineamiento de las secuencias. Fue detectado leucina (L) en la hélice $\alpha 2$ y metionina (M) en la hélice $\alpha 4$ de ambos tripanosomátidos.

2.2.2 Análisis estructural focalizado: MOTIVOS Y ESTRUCTURA

Motivo MIM-2

Tal como se ha demostrado hasta aquí, la CTR presentó una variable disposición espacial, presumiblemente por tratarse de una región muy flexible y, en parte, desordenada (**FIGURA 8 y FIGURA 14**). Dentro de esta región, el *Linker 2* de TbVps32 y TcVps32, se presentó como una región sin estructura periódica y que, por lo tanto, resultó difícil predecir su orientación espacial. Sin embargo, los modelos generados mostraron dos posiciones similares que podrían estar vinculadas a su probable funcionalidad: englobando la hélice $\alpha 5$ en TbVps32, o próximo a ella en TcVps32 (**FIGURA 17**). Respecto a la hélice $\alpha 5$, se pudo apreciar la disposición espacial que adquiere en relación con la hélice $\alpha 6$, resguardando al *Linker 2* y formando una especie de bolsillo inaccesible. Esto fue importante teniendo en cuenta que el motivo MIM-2 se ubica en esta región y actúa como *target* específico de proteínas adaptadoras y de la ATPasa Vps4, según se ha descrito en Snf7.

Tal como ocurre en otros organismos eucariotas, la disposición del *Linker 2* en relación con la hélice $\alpha 5$ podría indicar la existencia de un mecanismo regulatorio en el que ambas

estructuras son partícipes (Shim et al., 2007). La hélice $\alpha 5$, tanto en *H. sapiens* como en levaduras, es conocida como hélice *autoinhibitoria*, denominación recibida por su capacidad de modular el cambio conformacional de Vps32 desde su estado cerrado (monómero) a su estado abierto (oligómero y polímero), o viceversa. En un estudio estructural se ha reportado que la hélice $\alpha 5$ de Snf7 posee la capacidad de ubicarse espacialmente próxima al haz de cuatro hélices o *core domain* ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$) durante la conformación cerrada o monomérica de la proteína (**FIGURA 18**) y, asimismo, puede disponerse espacialmente alejada de este conglomerado de hélices permitiendo se constituya el estado abierto de Snf7 (Buchkovich et al., 2013; Lata et al., 2008; Shen et al., 2014; Tang et al., 2015).

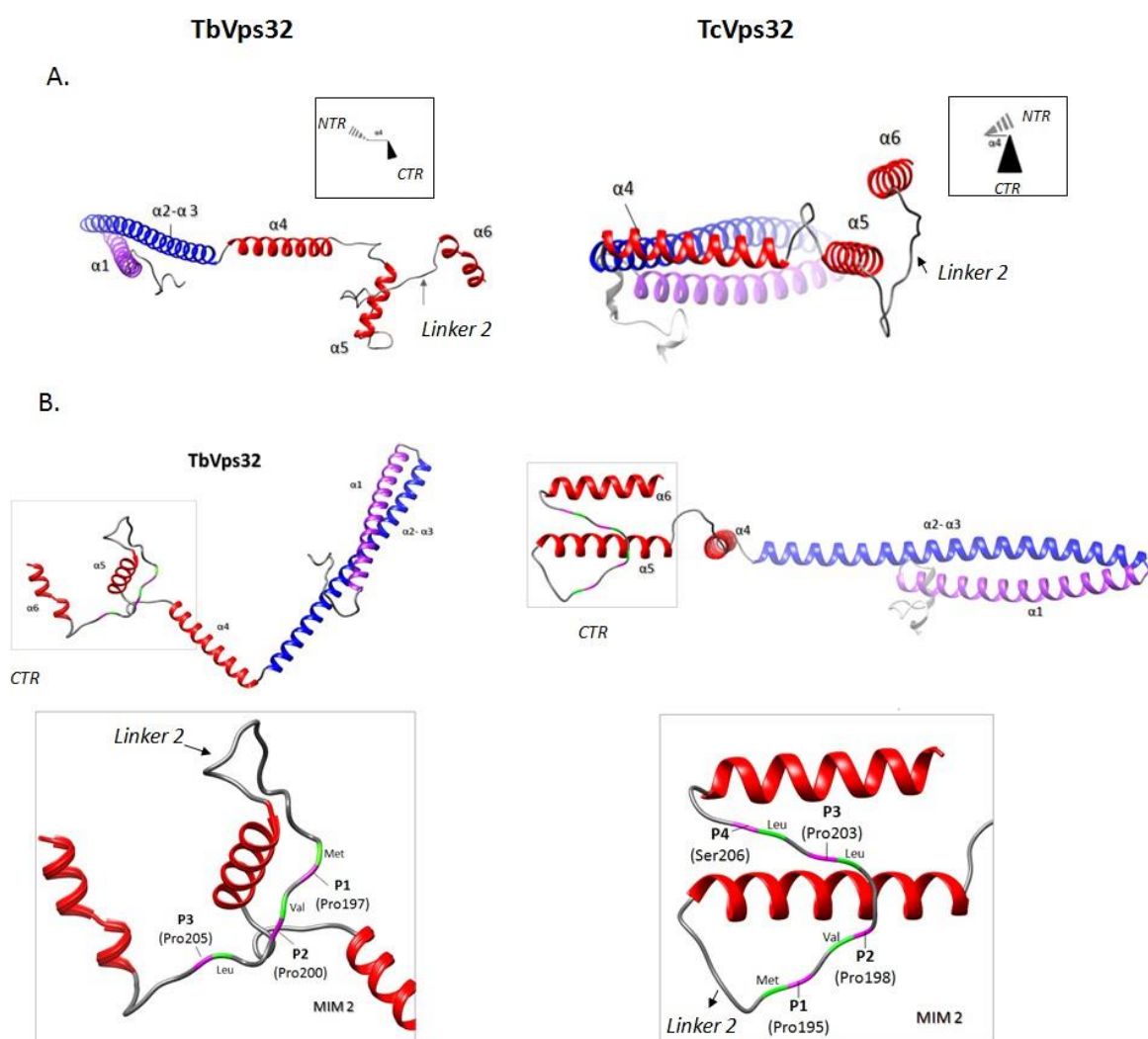


FIGURA 17. Perfiles estructurales de la CTR de TbVps32 y TcVps32. A. Esta región está compuesta por

las hélices $\alpha 5$, $\alpha 6$ y la región *Linker2* que las conecta. En ambos tripanosomátidos, se observa la misma disposición de la hélice $\alpha 4$ organizando ambas regiones estructurales y las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ resguardan la región *Linker 2* generando, a simple vista, una especie de “bolsillo”. El *Linker 2*, por su parte, se encuentra en una relación estrecha con la hélice $\alpha 5$, la hélice descrita en Snf7 como *autoinhibitoria* ya que es fundamental en los cambios conformacionales de la proteína. **B. Motivo MIM-2 de TbVps32 y TcVps32 entorno a la hélice $\alpha 5$ involucrada en los cambios conformacionales.** El motivo MIM-2 está ubicado, aproximadamente, entre los aminoácidos 196 y 205, sobre el *Linker 2* que une la hélice $\alpha 5$ y la hélice $\alpha 6$. Este motivo está compuesto por aminoácidos de prolina (P) numerados como P1, P2, P3 y P4. Tanto P1, P2 como P3 están precedidos por aminoácidos hidrofóbicos: metionina (Met), valina (Val) y leucina (Leu). Se observa cómo MIM-2, rodea a la hélice $\alpha 5$ lo cual es llamativo por la relevancia de esta hélice durante los cambios conformacionales.

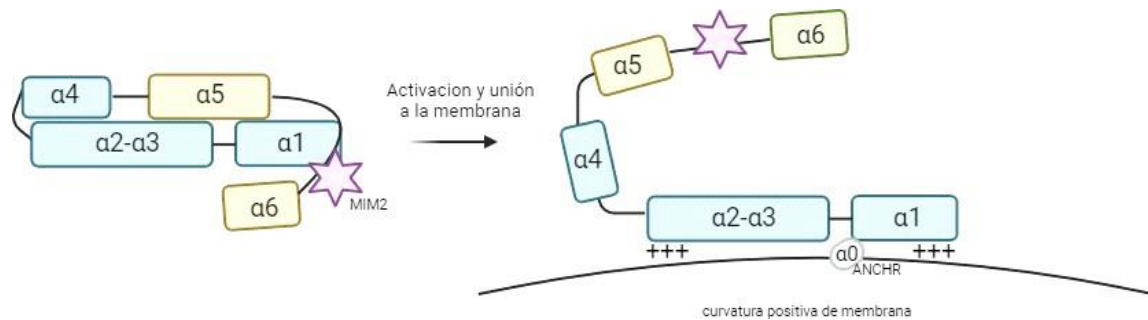


FIGURA 18. Hélice autoinhibitoria $\alpha 5$ de Vps32. La hélice $\alpha 5$ se ubica sobre las hélices que componen el *core domain* (hélices celestes) lo cual genera que la proteína adquiera una conformación cerrada. Durante la activación y unión a la membrana de Vps32, la hélice $\alpha 5$ se desplaza y aleja del *core domain* con lo cual, la proteína adquiere una conformación activa o abierta. Figura modificada de Tang et al., 2015.

De esta manera, la hélice $\alpha 5$ *autoinhibitoria* ubicada en la CTR, es fundamental para los cambios conformacionales. Según los autores, para que ocurra esta versatilidad descrita en la hélice $\alpha 5$, es necesario una región *Linker* sumamente flexible que la conecte a la hélice $\alpha 4$ (Shen et al., 2014). En este contexto, los resultados obtenidos (**FIGURA 8**) demostraron que los *Linker 1* y *Linker 2* constituyen regiones con significativa flexibilidad (altos valores de RMSF), comportamiento análogo al observado en la estructura completa Snf7. Debido a que estas regiones de TcVps32 y TbVps32 resultaron tan flexibles como las de Snf7, fue presumible que un mecanismo análogo al citado se desarrolla en ambos tripanosomátidos. Por tanto, se puede considerar la posibilidad de que la hélice $\alpha 5$ pueda modificar su disposición respecto del core durante los cambios conformacionales gracias a la flexibilidad del *Linker 1*.

Debido a que los aminoácidos que conforman esta región son aminoácidos que no forman parte

de una estructura periódica, y, tal como se ha demostrado, presentan mayores grados de libertad para moverse, nos fue de interés determinar si el número de tales aminoácidos conformando el *Linker 1* podría estar vinculado a los conceptos de flexibilidad y desorden global de la región. Para evaluar y comprobarlo, a continuación, se llevó a cabo la evaluación del número de aminoácidos que conforman el *Linker 1* (**FIGURA 19**) dando como resultado un total de 5 en Snf7 (Gly154-Ala155-Ans156-Glu157-Val158), mientras que el número de aminoácidos fue de 9 tanto en TbVps32 (Gln154-Pro155- Leu156-Asp157-Ala158-Gln159-Val160-Val161- Asp162) como en TcVps32 (Arg156-Gln157-Pro158-Leu159-Ser161-Gln162-Leu163-Leu164- Asp165). Sin embargo, si bien TcVps32 y TbVps32 presentaron un mayor número de aminoácidos en esta región respecto a Snf7, la flexibilidad del *Linker 1* fue similar entre estructuras tal como se demuestra en la **FIGURA 8**. Por lo tanto, el número de aminoácidos no constituyó un factor que determine la (mayor o menor) flexibilidad. Evidentemente, no hubo una relación directa entre la longitud del *loop* y su flexibilidad. Más bien, la flexibilidad parecía estar asociada tanto a las características intrínsecas de los aminoácidos que conforman el *Linker 1*, como a la posible existencia de un mecanismo regulatorio, en el que la interacción con estas regiones u otras proteínas se modifique su grado de flexibilidad.

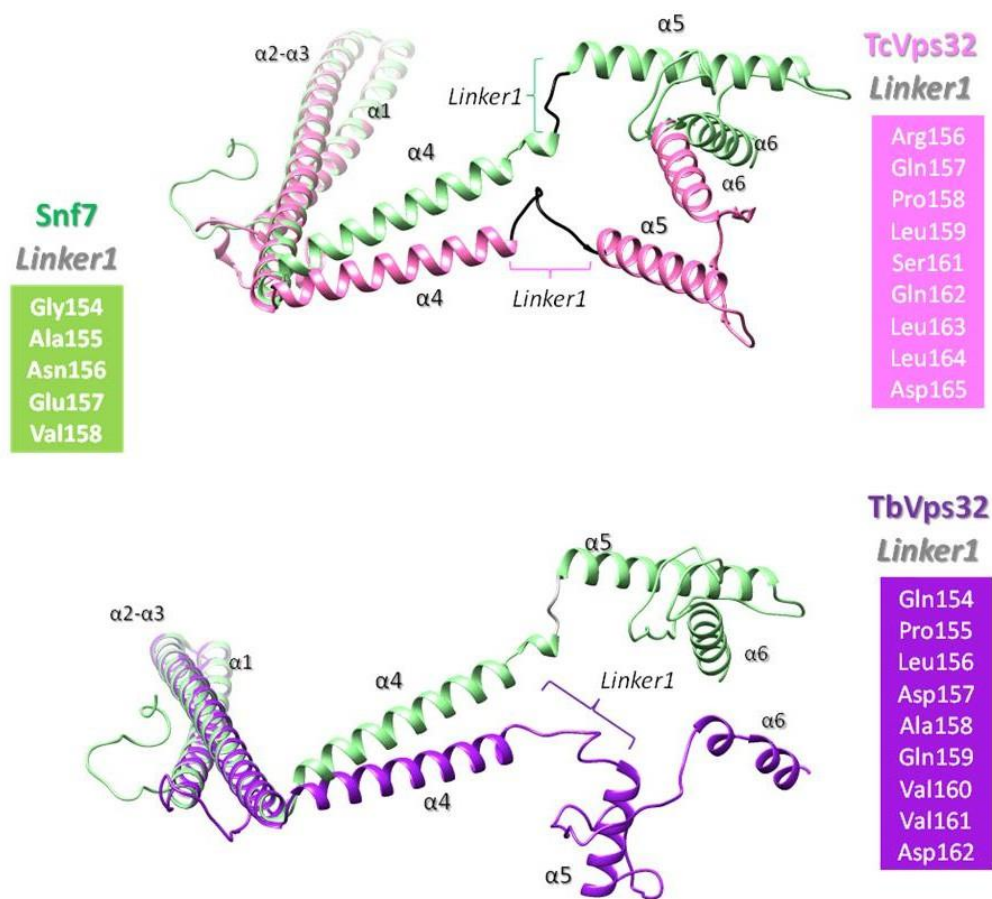


FIGURA 19. Medición del *Linker 1* y su relevancia sobre la hélice $\alpha 5$ y los cambios conformacionales.

Procedimos en la medición de la longitud del *Linker 1* mediante la cuantificación de sus aminoácidos con el objetivo de evaluar la flexibilidad del mismo ya que contribuye al movimiento de la hélice $\alpha 5$ y, en consecuencia, a los cambios conformacionales de Vps32. Snf7 de *S. cerevisiae* (verde), TbVps32 (violeta) y TcVps32 (rosa). Tanto TbVps32 como TcVps32 exhiben mayor longitud del *Linker 1* respecto a la calculada para Snf7, lo cual, a simple vista, parecería dotar de mayor flexibilidad a la CTR.

Tal como se ha destacado anteriormente, la existencia de un mecanismo regulatorio entre la hélice $\alpha 5$ y el *Linker 2* podría estar relacionado a la disposición que éste adopta en torno a dicha hélice (**FIGURA 20**). Si bien al respecto no hay evidencias estructurales disponible, resulta notable que el motivo *target* de la ATPasa Vps4, MIM-2, rodee a una de las hélices más destacadas en cuanto a cambio conformacional de Vps32 se refiere, la hélice $\alpha 5$ de *autoinhibición* (Tang et al., 2015). Esto podría no constituir una coincidencia o una disposición espacial arbitraria, sino el resultado de un principio funcional estrechamente ligado a la regulación de la proteína.

ANCHR y hélices NTR

Como se ha descrito de manera general, tanto para Snf7 como para su ortólogo CHMP4B, la NTR posee la función de anclaje a la membrana y la CTR constituye la región regulable con capacidad de interacción con otras proteínas y susceptible a la modulación de las mismas (Shim et al., 2007). Respecto a la NTR, las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ del NTR de TbVps32 y TcVps32 (**FIGURA 4**) se ubicaron espacialmente próximas entre sí estableciendo interacciones, tal como se observa en la estructura de Snf7 PDB, obtenida por cristalografía de rayos X (**FIGURA 2A**), y en la estructura completa de Snf7 obtenida mediante *RaptorX* (Tang et al., 2015) (**FIGURA 5A**). Esta relación tan estrecha entre hélices se evidenció a lo largo de las dinámicas de todos los modelos estructurales ensayados, lo cual deslizaba la idea de la rigidez de la región. Asimismo, a través de las dinámicas, las hélices ocupaban una disposición espacial constante a lo largo del tiempo. El análisis de flexibilidad de las regiones, pudo confirmar la rigidez de la región habiéndose registrado valores de RMSF cercanos a cero concentrados en la hélice $\alpha 1$ y en la primera porción de la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (**FIGURA 7 y 8**). Estos resultados demostraron que la organización estructural de las hélices NTR puede deberse a las interacciones químicas establecidas entre las mismas. Por otro lado, estos resultados advirtieron sobre la conservación de la NTR, específicamente en lo que se refiere a las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$.

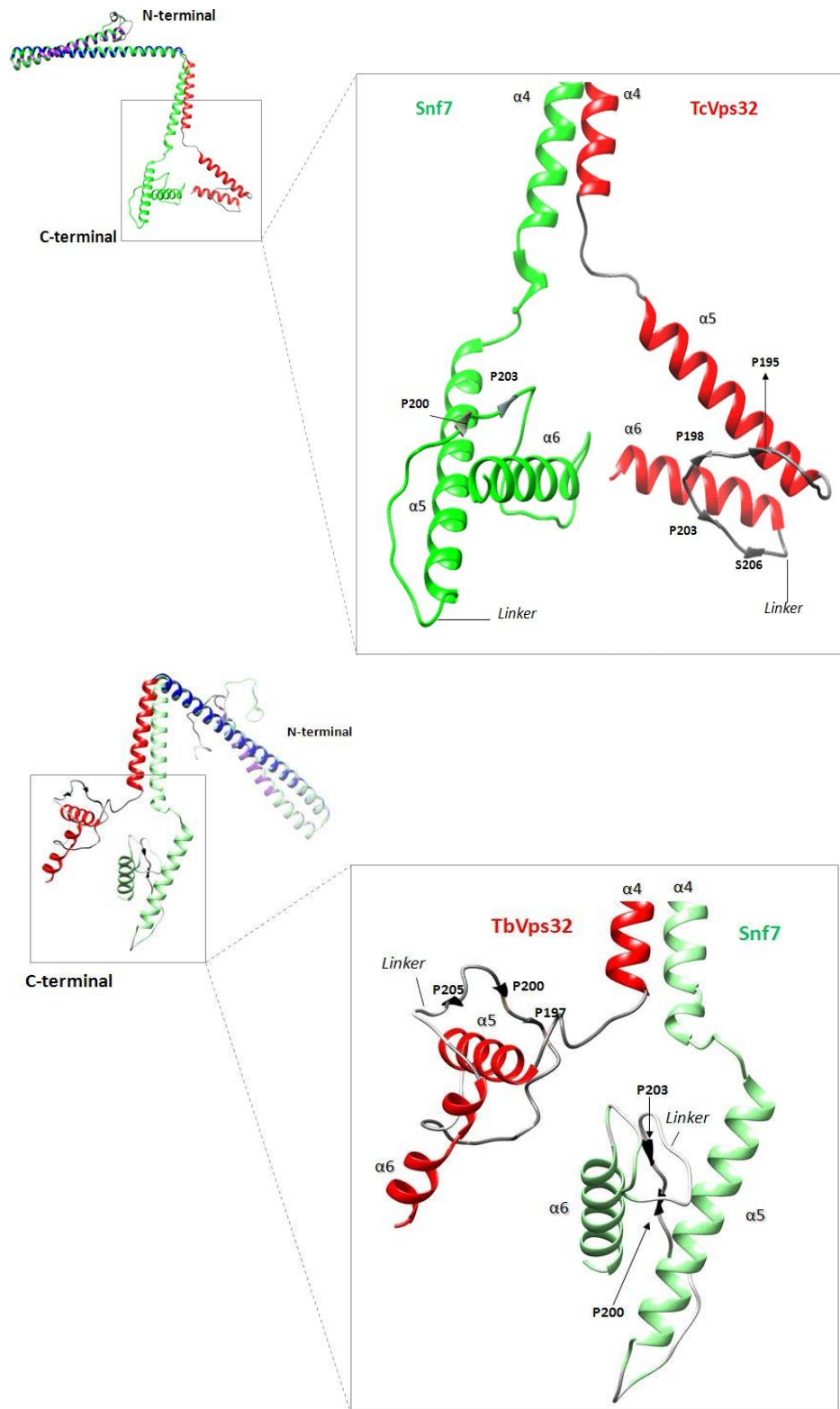


FIGURA 20. MIM-2 rodea la hélice $\alpha 5$. Se observa la distinta disposición espacial de la CTR de TcVps32 y TbVps32 respecto a la de su ortólogo Snf7. Tanto en Snf7 como en TbVps32 y TcVps32, se observa

que el motivo MIM-2, ubicado en el *Linker 2*, se encuentra rodeando a la hélice $\alpha 5$ al tiempo que es “protegido” por esta hélice y la hélice $\alpha 6$. Aquí se detallan los residuos característicos y conservados que conforman el MIM-2 de Snf7, TcVps32 y TbVps32.

Continuando con los análisis al respecto, los autores reportaron que la hélice $\alpha 1$ de Snf7 presenta una longitud aproximada de 60Å y las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ en su conjunto, una longitud de 90Å (Tang et al., 2015) (**FIGURA 21**). Dado que la estructura cristalográfica no cuenta con la CTR, utilizamos la predicción estructural de Snf7, previamente generada, para la comparación de las longitudes de las hélices. De esta manera, las hélices del modelo estructural completo de Snf7 exhibieron casi idéntica longitud que las del *core domain* de Snf7 PDB. Misma observación se le atribuyó al modelo propuesto para TcVps32 y TbVps32. Asimismo, la hélice $\alpha 4$ mostró la misma longitud que la calculada para la misma hélice de TcVps32 y TbVps32. De esta manera, la similitud estructural, la disposición espacial del *core* y la longitud de estas hélices la NTR podrían reflejar la conservación funcional de esta región en cuanto al anclaje a las membranas y a los cambios conformacionales. Cabe destacar que las diferencias de longitudes calculadas para algunas de las hélices resultaron sutiles, considerando que cada visualizador aplica criterios propios y define los elementos de estructura secundaria de manera particular (**FIGURA 21**).

Respecto a la función de anclaje a las membranas, numerosos aminoácidos de lisina (Lys) en las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de Snf7 de *S. cerevisiae* se encontraron implicados en la asociación directa con las membranas (Teis et al., 2008) (**FIGURA 22**). Dichos residuos fueron detectados en TbVps32 y TcVps32, en análoga disposición a la de Snf7, distribuidos al inicio y final de las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (**FIGURA 23**), lo que evidenció la conservación de las lisinas en dichas posiciones y reforzó su papel clave en el anclaje a membranas. En este contexto, la conservación estructural de las hélices de la NTR en TcVps32 y TbVps32 y la conservación de las lisinas en las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$, sugiere que estas hélices cumplen la función de anclaje reportada en Snf7 de *S. cerevisiae* y CHMP4B de *H. sapiens* y, asimismo, podrían mantener el mismo mecanismo dilucidado en estos organismos (Shim et al., 2007).

En síntesis, estos resultados podrían indicarnos que el mecanismo de anclaje de Vps32 sobre las membranas probablemente se haya mantenido en tripanosomátidos.

En el proceso tan específico de anclaje, el motivo más destacado de la NTR es el motivo ANCHR, el cual que estabiliza la unión a las membranas por sus características anfipáticas (Buchkovich et al., 2013) **(FIGURA 15 de Búsqueda y detección de genes Vps32)**. En todos los modelos obtenidos se observó que esta región que contienen el motivo ANCHR, adquiere diferentes disposiciones espaciales **(FIGURA 15)**. De hecho, en las dinámicas ensayadas para cada modelo, se pudo observar cómo esta región adquiriría diferentes disposiciones espaciales o bien visitaba diferentes regiones en el espacio.

ANCHR se encontró ubicado en los primeros once aminoácidos en los modelos estructurales de TbVps32 y TcVps32, tal como fue descrito en Snf7 **(FIGURA 24)**, y no sólo preservaba la ubicación reportada en otros organismos, sino también la organización química de los aminoácidos del motivo **(FIGURA 16 de Búsqueda y detección de genes Vps32)**. En conjunto, estos resultados reforzaban la idea de que en ambos tripanosomátidos se conserva el mecanismo clásico de anclaje a membranas.

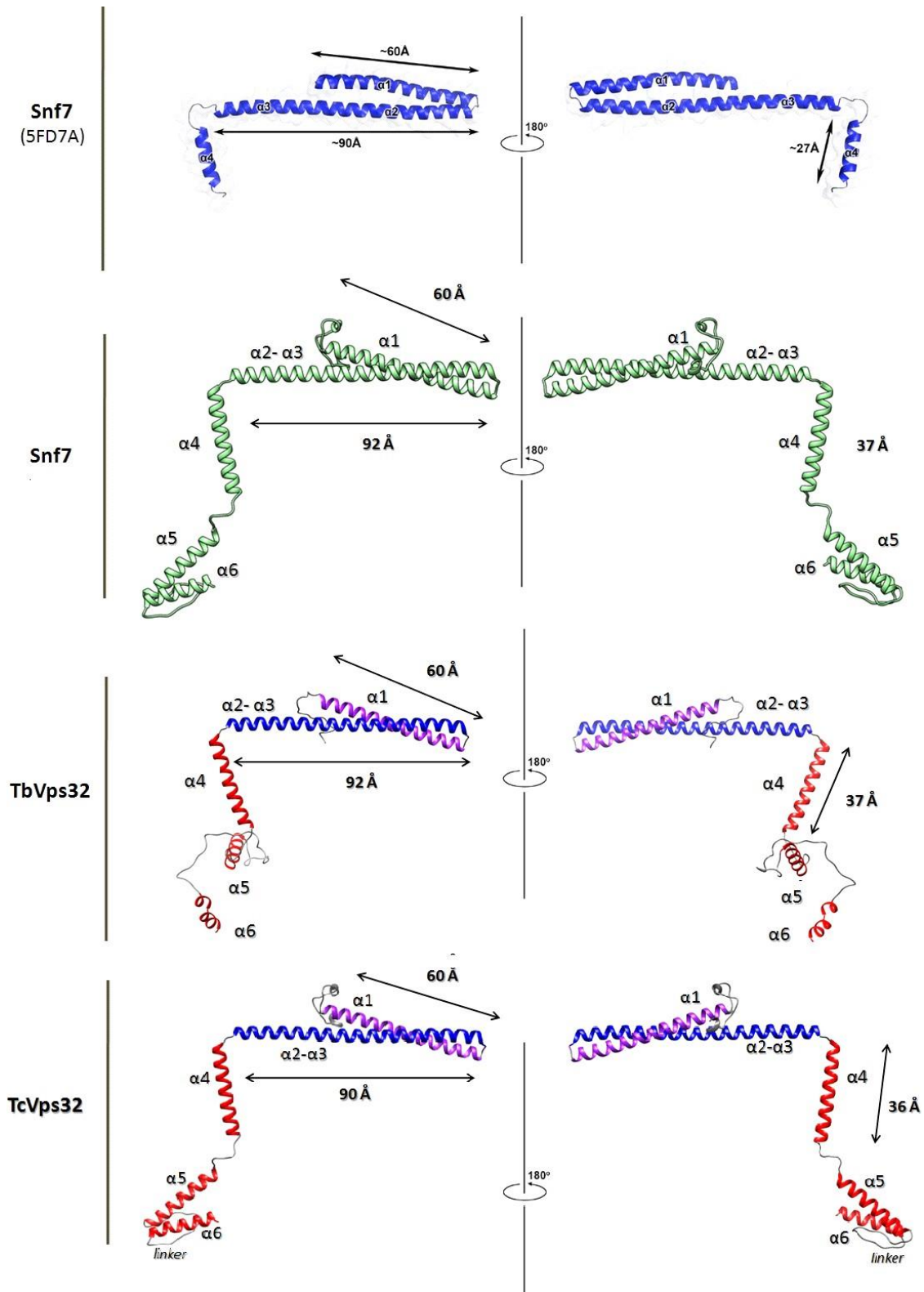


FIGURA 21. Modelo estructural de Snf7 obtenido por Cristalografía de Rayos X y modelo estructural

de TbVps32 y TcVps32 obtenido mediante RaptorX (estrategia sin templado). La estructura tridimensional de Snf7 obtenida por Cristalografía de rayos X se compone de las hélices $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$. Las longitudes de las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de TbVps32 y TcVps32 coinciden con la longitud reportada en bibliografía para Snf7 (azul) y la longitud de Snf7 estructura completa o Modelo de Snf7 sin templado (verde).

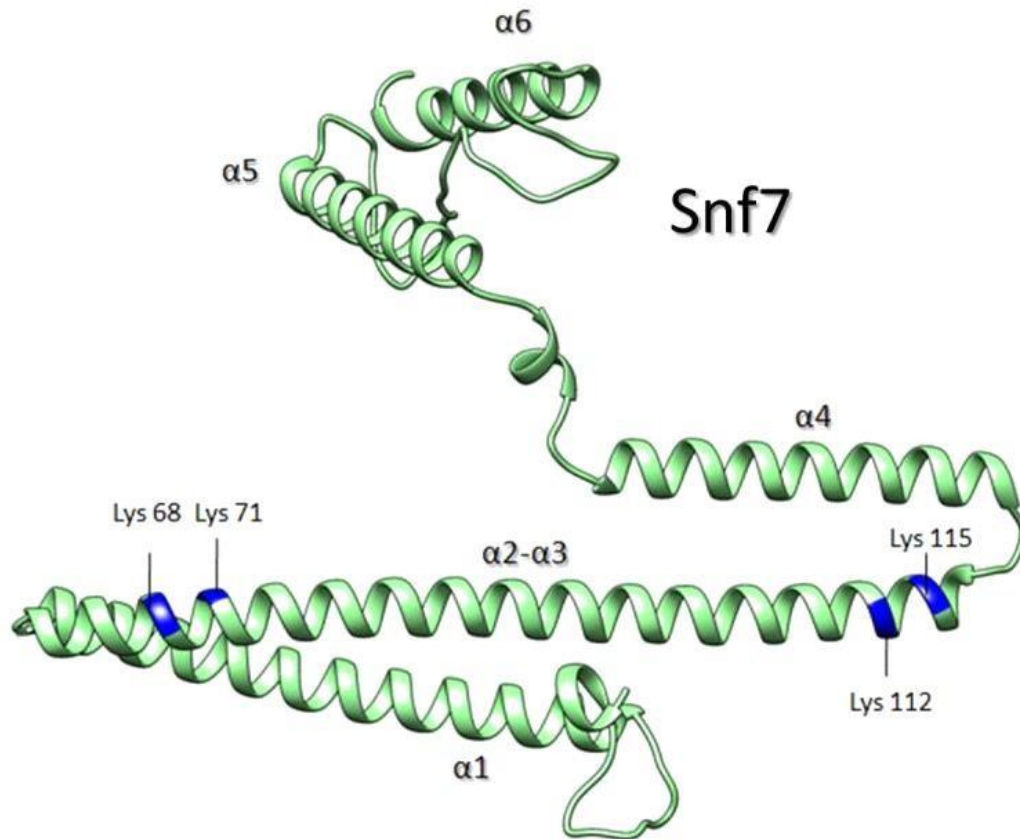


FIGURA 22. Lisinas en la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ NTR de Snf7 de *S. cerevisiae*. Se han reportado las secuencias ricas en residuos de lisinas (Lys) participantes en el proceso de anclaje a la membrana. Las mismas fueron identificadas en la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de Vps32 de organismos como *H. sapiens*, *M. musculus*, *S. cerevisiae* y *X. laevis*.

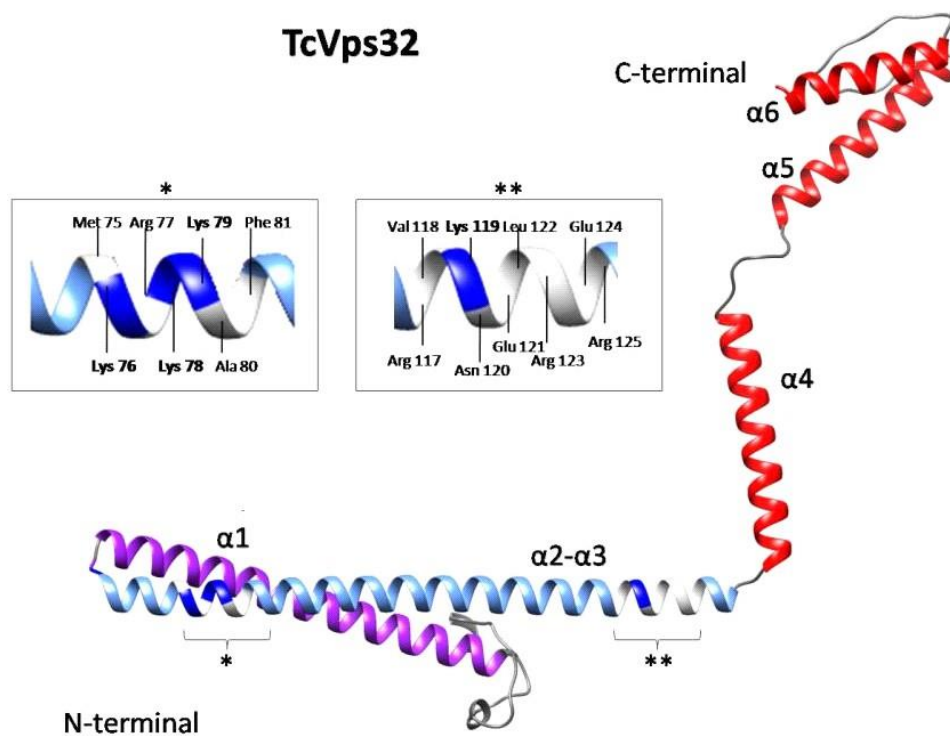
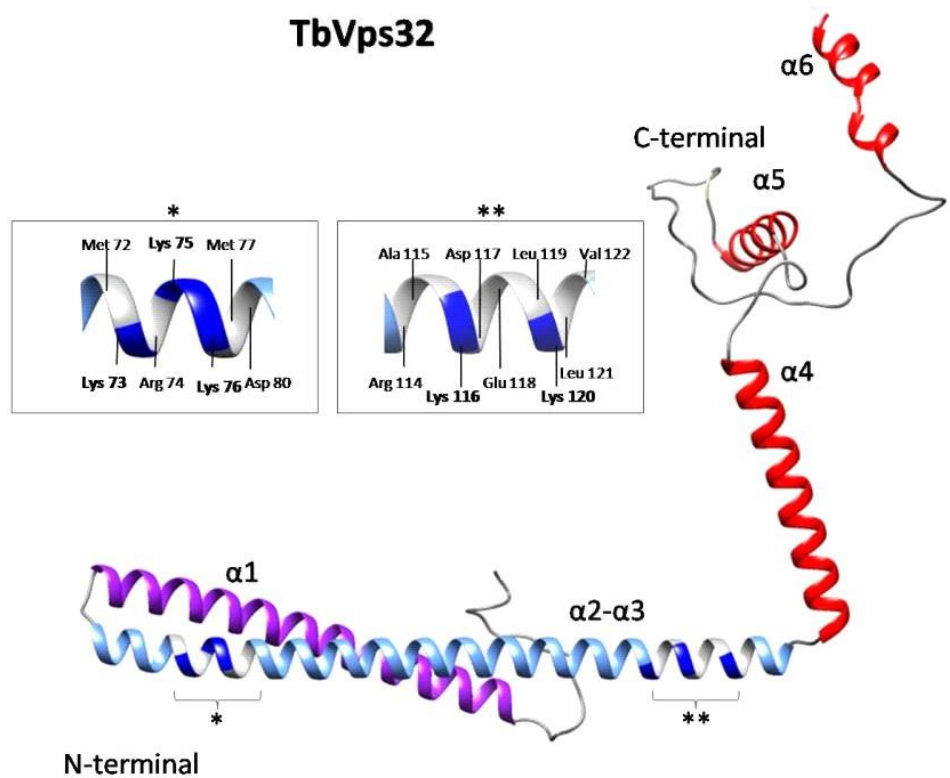


FIGURA 23. Lisinas en hélice $\alpha 2\text{-}\alpha 3$ NTR. Las regiones ricas en Lisinas fueron identificadas en las

secuencias de TbVps32 y TcVps32 en la hélice $\alpha 2$ - $\alpha 3$. En los modelos estructurales obtenidos mediante RaptorX, pudimos observar que se respeta esta disposición de manera que se puede apreciar la ubicación de los aminoácidos lisinas (Lys) coloreados en azul y los aminoácidos entorno a ellos, coloreados en gris claro. Esta disposición sugiere la gran conservación de los aminoácidos Lys en esta región y la probabilidad que los mismos participen en el mecanismo de anclaje a las membranas cuando se activa ESCRT-III.

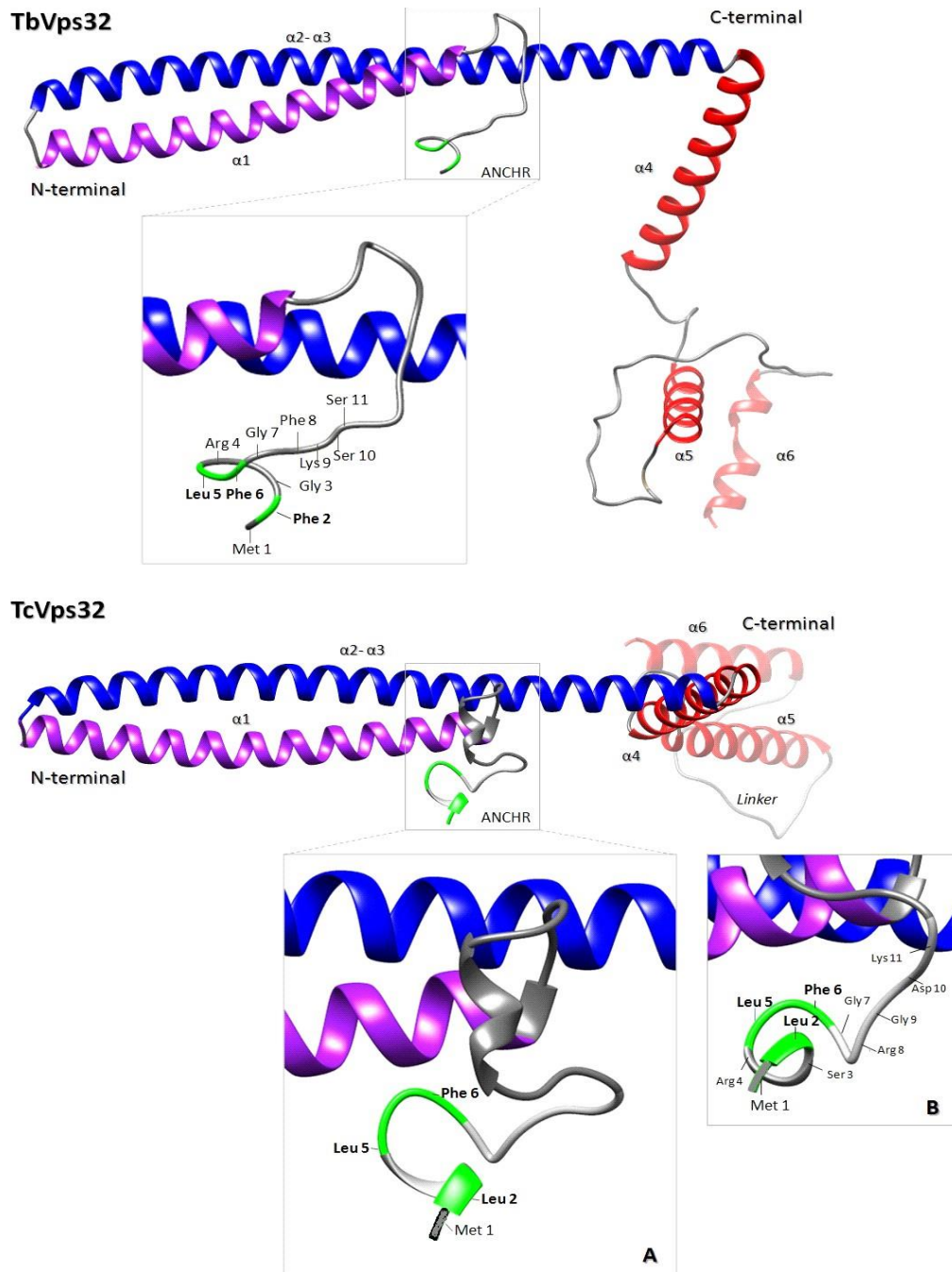


FIGURA 24. Motivo ANCHR en el extremo N-terminal de TbVps32 y TcVps32. La presencia de este motivo en Vps32 le confiere estabilidad de unión a las membranas. Los aminoácidos no polares Phe2,

Leu5 y Phe6, se encuentran conservados en TbVps32 y TcVps32 y se encuentran coloreados en verde. En el caso de TcVps32, en **A.** se detallan los residuos más importantes de ANCHR y en **B.** se detalla la totalidad de los residuos que lo componen. Fenilalanina (Phe), leucina (Leu).

3-CONCLUSIONES PRELIMINARES Y GENERALES DE LOS MODELOS COMPLETOS TbVps32 y TcVps32

1-A través de nuestro análisis, se pudo observar la evidente conservación de la NTR de Vps32 de ambos tripanosomátidos: la hélice $\alpha 2$ se encuentra físicamente conectada a la hélice $\alpha 3$ y ambas mantienen una relación estrecha con la hélice $\alpha 1$. Estas interacciones entre hélices se mantuvieron a lo largo de las dinámicas ensayadas, lo que podría coincidir con nuestros resultados respecto a la flexibilidad y desorden de las regiones (ambas hélices son rígidas y ordenadas).

2-La CTR de TbVps32 y TcVps32, que constituye la región reguladora, presentó características estructurales comunes a las reportadas en otros organismos. La hélice $\alpha 4$, única hélice flexible y ordenada de Vps32, mostró una disposición espacial particular que parecía organizar las regiones terminales. Por ello, esta hélice actuando como un “centro organizador” de la NTR y de la CTR.

La flexibilidad del *Linker 1* podría contribuir en la capacidad de Vps32 de alternar entre un estado abierto a uno cerrado, y viceversa, de manera más “fluida”.

Por su parte, el *Linker 2*, región flexible y desordenada, que contiene al motivo MIM-2, presentó una relación estrecha con la hélice $\alpha 5$. Esto podría indicar que el mecanismo de regulación CTR se encuentra conservado en ambos tripanosomátidos.

Caracterización funcional de Vps32 en tripanosomátidos

1. TcVps32 de *Trypanosoma cruzi*

En *T. cruzi*, la escasez de herramientas disponibles para llevar a cabo el estudio funcional de proteínas y su localización subcelular se debe a sus singulares características moleculares. A diferencia de lo que ocurre en *T. brucei*, *T. cruzi* no presenta la maquinaria necesaria para producir el silenciamiento génico mediante RNAi, de manera que durante los últimos años la principal estrategia abordada para el estudio de estos organismos ha sido la sobreexpresión proteica. Sin embargo, recientemente el sistema CRISPR/Cas9 de edición genética ha comenzado a implementarse como herramienta de estudio en ambos tripanosomátidos.

En nuestro laboratorio, se llevaron a cabo dos estrategias de sobreexpresión que contemplaron dos vectores que se diferencian entre sí por el nivel de expresión proteica resultante. Por un lado, el vector pTREX y, por el otro, pRIBOTEX. Si bien ambos vectores son herramientas de sobreexpresión constitutiva, mientras que pTREX constituye un vector cuyos niveles de expresión son muy altos, pRIBOTEX representa un sistema más moderado (Lorenzi et al., 2003; Martínez-Calvillo, López, et al., 1997; M. Vazquez, 2007). En nuestros estudios, la implementación de ambas estrategias de manera simultánea permitió evidenciar el efecto diferencial en los niveles de sobreexpresión e inferir acerca del rol de la proteína Vps32 en la biología del parásito y los mecanismos regulatorios implicados.

De esta manera, el gen TcVps32 fue insertado en el vector pTREX y la versión del gen TcVps32 con la adición de una etiqueta de hemaglutinina (HA) fue insertada en el vector pRIBOTEX. Con el objetivo de evaluar la localización subcelular de la proteína, la adición de esta etiqueta se restringió únicamente a este vector por su moderado nivel de expresión, lo que conllevaría a obtener resultados más confiables y carentes de artefactos. Asimismo, la adición de la etiqueta (HA) se llevó a cabo en el extremo N-terminal de TcVps32 con el objetivo de no interferir en la regulación descrita sobre la CTR de Vps32 y los cambios conformacionales asociados.

De esta manera, los parásitos de la cepa Y en estadio epimastigote fueron transfectados y

seleccionados de manera simultánea, en placa y en botella, durante cuatro semanas completas. Luego de este proceso, en ambos cultivos sobreexpresantes se obtuvieron poblaciones celulares morfológicamente heterogéneas y de poca densidad celular respecto a los cultivos WT y los cultivos control (transfectados con el vector vacío). Al respecto, el comportamiento de la línea celular TcVps32pTREX se caracterizó por la baja densidad celular, escasa o nula movilidad de las células, e incluso, células biflageladas. Video: [Vps32pTREX](#) .

De hecho, la densidad de los cultivos TcVps32pTREX y HA-TcVps32pRIBOTEX disminuía semana tras semana, lo cual dificultaba la evaluación de la capacidad proliferativa mediante curvas de crecimiento y la obtención de extractos proteicos a ser evaluados por Western blot. Estos mismos comportamientos y/o resultados fueron observados durante las siguientes transfecciones llevadas a cabo: tres transfecciones en el caso de HA-TcVps32pRIBOTEX y sólo una transfección para TcVps32pTREX. Debido a estas dificultades, el análisis microscópico fue clave para evaluar los cultivos, tal como se verá más adelante.

Respecto a los cultivos HA-Vps32pRIBOTEX, los resultados que se muestran a continuación pudieron obtenerse a partir de la tercera transfección de parásitos, ya que las transfecciones previas tuvieron sus complicaciones durante el periodo de selección y post- selección. Es decir, los parásitos morían durante el proceso de selección o, luego del mismo, los parásitos sobreexpresantes no recuperaban la capacidad proliferativa. De hecho, tardaban dos o, en ocasiones, tres semanas en alcanzar una concentración 1×10^7 parásitos/mL y finalmente, morían. Es importante aclarar en este punto, que los cultivos pRIBOTEX y WT presentaban capacidad proliferativa normal y similar, es decir, luego de una semana de repique habitual, los valores rondaban en $6,5 \times 10^7$ parásitos/mL.

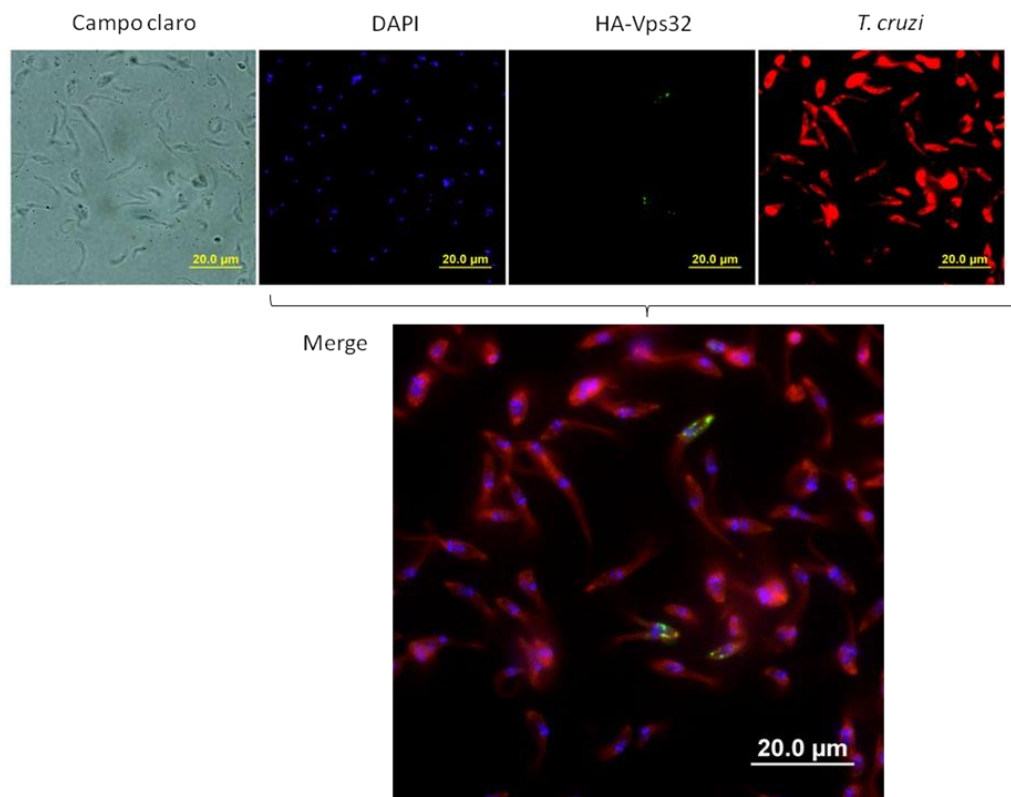
Particularmente en el caso de HA-TcVps32pRIBOTEX, luego de la tercera transfección de parásitos, nuevamente se observó la afectación de la capacidad proliferativa de los cultivos y era dificultoso el mantenimiento de las densidades celulares, recurriendo, muchas veces a no efectuar los repiques habituales para mantener una densidad celular que no significase la muerte de los parásitos. Sin embargo, tal como se verá a continuación, se evidenciaron ciertos avances al respecto.

-

Al realizar la tercera transfección y el proceso de selección correspondiente, pudimos evidenciar el número de células con la marca para la etiqueta HA mediante microscopia de fluorescencia. Tal como puede observarse, el porcentaje de parásitos transgénicos HA-TcVps32pRIBOTEX fue del 13%, de manera que por campo observamos en promedio 3 o 4 parásitos con marca HA de un total de 28 (**FIGURA 1A**). Asimismo, a la tercera semana post-selección se obtuvo un extracto proteico apto para evaluarse mediante WB. De esta manera, se obtuvo una banda confirmatoria HA-Vps32 entre los 32 kDa y los 46 kDa, siendo el PM teórico de 26 kDa (Shen et al., 2014) (**FIGURA 2**).

Debido a la experiencia previa, varios viales fueron preparados y congelados a partir de este cultivo correspondiente a la tercera semana post-selección. Sin embargo, es importante destacar que algunos de ellos no eran viables luego del proceso de descongelamiento, constituyendo cultivos perdidos rápidamente. En otros casos, aquellos viales que lograban recuperarse habían perdido la marca HA lo cual dificultaba la continuidad y repetición de nuestros ensayos.

A.



B.

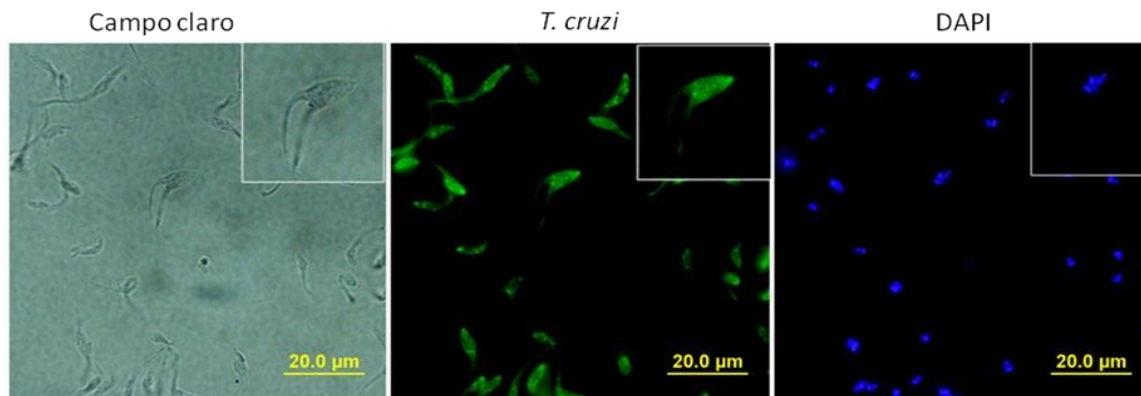


FIGURA 1. Análisis preliminar de HA-TcVps32pRIBOTEX. Luego de 21 días de selección post transfección, los parásitos fueron evaluados mediante microscopia de fluorescencia. **A.** Figura representativa del porcentaje de parásitos totales que expresan la proteína HA-Vps32 obtenido durante la tercera transfección llevada a cabo. La eficiencia de la transfección fue del 13%. Solo se realizó la superposición de las imágenes (Merge) de DAPI y anti-HA y anti- *T. cruzi*. **B.** Cultivo HA- Vps32 con morfología atípica y con atípico contenido de DNA. Se observa en el centro un parásito con dos flagelos y múltiples núcleos. Las células fueron incubadas con el anticuerpo anti- *T. cruzi* (verde) y DAPI (azul).

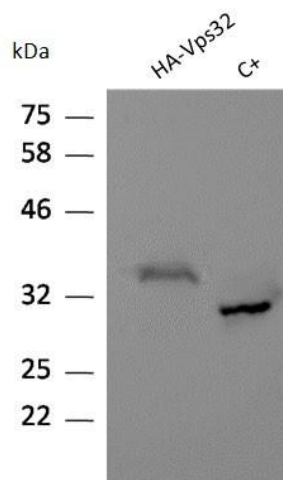
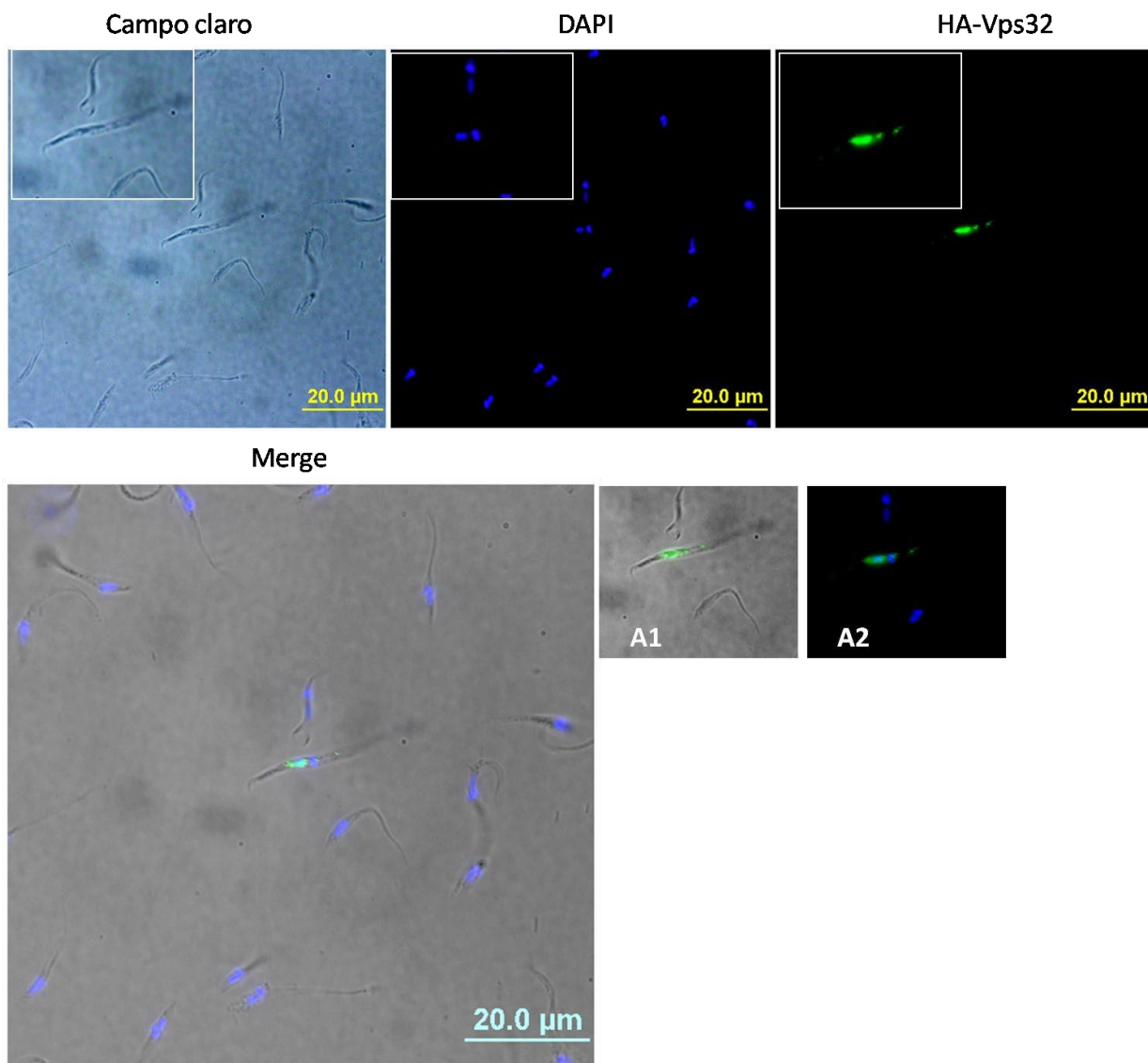


FIGURA 2. Expresión de la HA-TcVps32 en el estadio epimastigote de *T. cruzi*. Sobrenadante de extracto de proteína total (40µg de masa de proteínas) resuelto en SDS-PAGE 12% y transferido a membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el anticuerpo primario anti-HA y luego con anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con HRP. La banda HA-Vps32 se ubica entre los 32 kDa y 45 kDa. El control positivo (C+) se corresponde a un extracto de proteínas de una línea celular CL Brener que expresa una proteína con etiqueta HA de PM aproximadamente 30 kDa.

Los parásitos sobreexpresantes HA-TcVps32pRIBOTEX presentaron morfología y número aberrante de núcleos, kinetoplastos y flagelos (**FIGURA 1B y FIGURA 3**). Esto se pudo evidenciar de manera más clara a través de la marcación con el anticuerpo anti- *T. cruzi* y la tinción con DAPI (**FIGURA 1A**). Sumado a ello, la incubación con el anticuerpo anti- HA nos permitió apreciar la marca de la proteína HA-Vps32 en el citoplasma celular, misma ubicación

reportada en la base de datos *TrypTag* (<http://tryptag.org/>) (**FIGURA 3**).

A.



B.

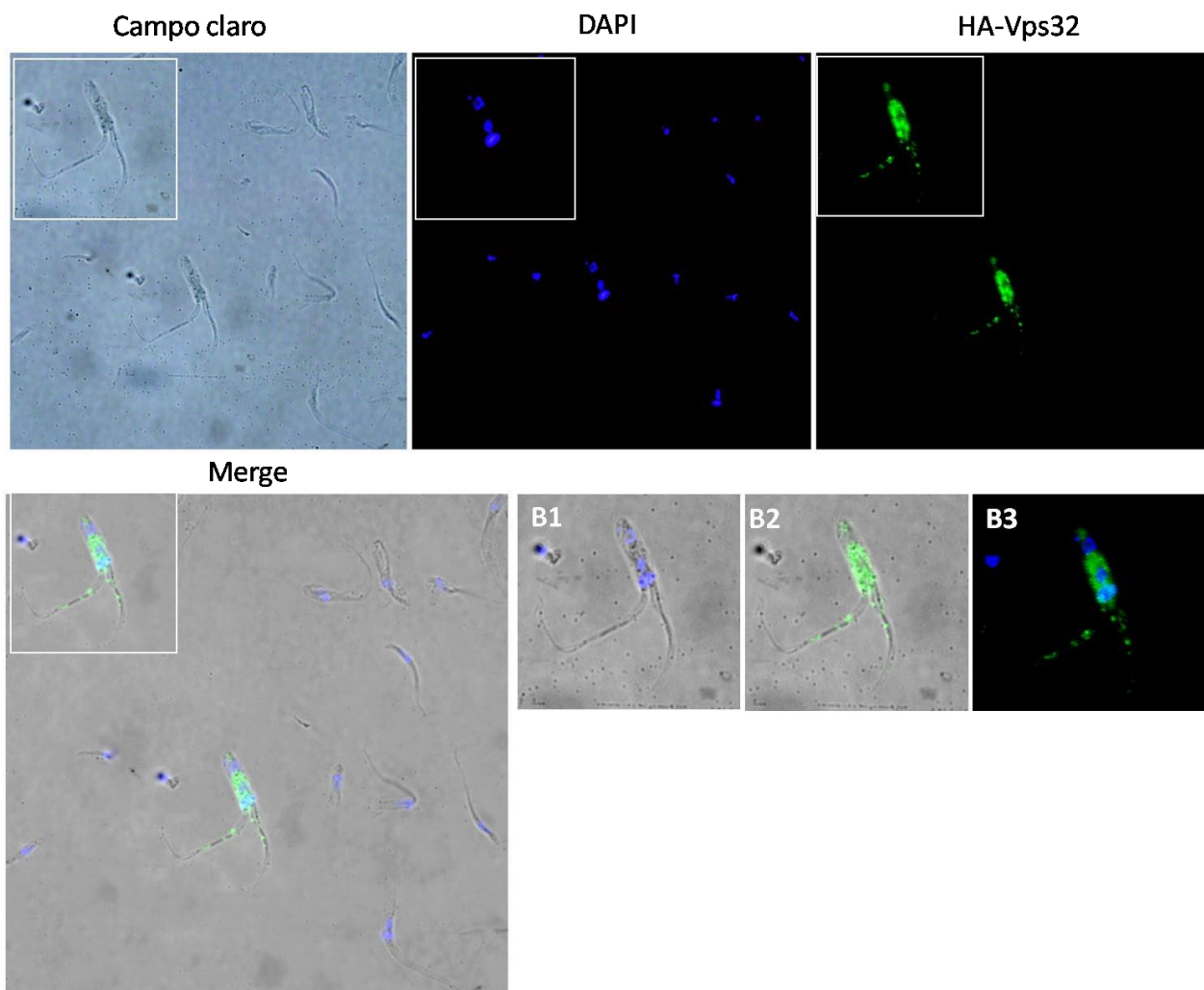


FIGURA 3. Línea celular HA-TcVps32pRIBOTEX. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-HA (verde) y DAPI (azul). Se puede evidenciar la marca HA-TcVps32 ubicada en el citoplasma y en ambos flagelos del parásito. Así mismo puede observarse en detalle cómo esta marca se distribuye en la zona donde se ubica el núcleo y el kinetoplasto, lo cual es compatible con la ubicación reportada para el sistema endocítico en Tripanosomátidos (**A2 y B3**). Nuevamente en esta imagen, también es notable la morfología aberrante de las células y la anomalía del contenido de DNA teñido, en ambos casos, con DAPI.

Según esta base de datos de localización subcelular de proteínas de *T. brucei* PCF, la localización específica de Vps32 se restringe a los endosomas del sistema endocítico (**FIGURA 4**). Esta localización reportada por la base de datos se correspondía con la expresión de TbVps32 con una etiqueta HA en el N-terminal, lo cual constituía un dato relevante ya que, la expresión de TbVps32 con etiqueta HA en C- terminal no había podido arrojar resultados.

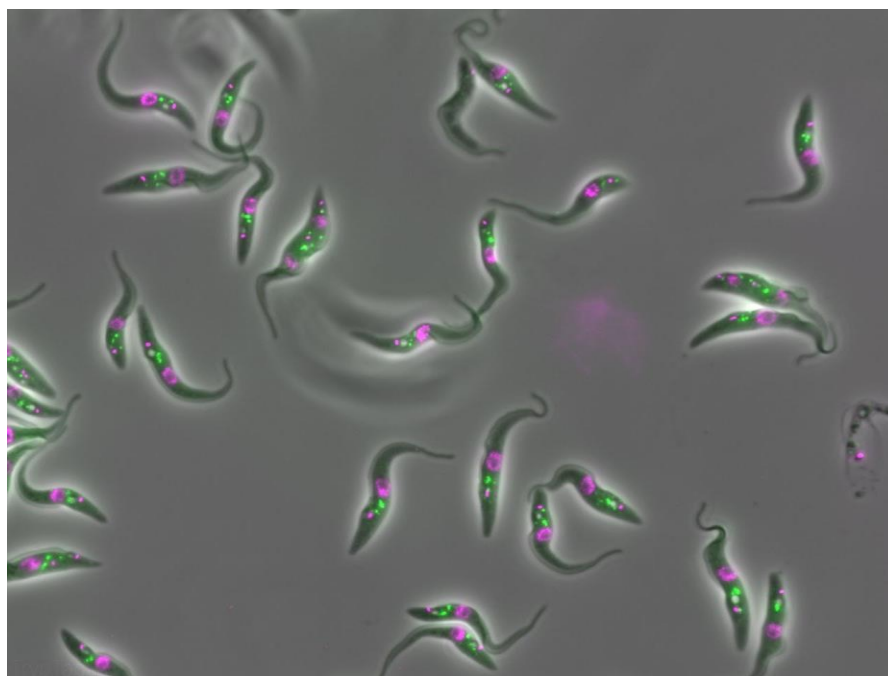
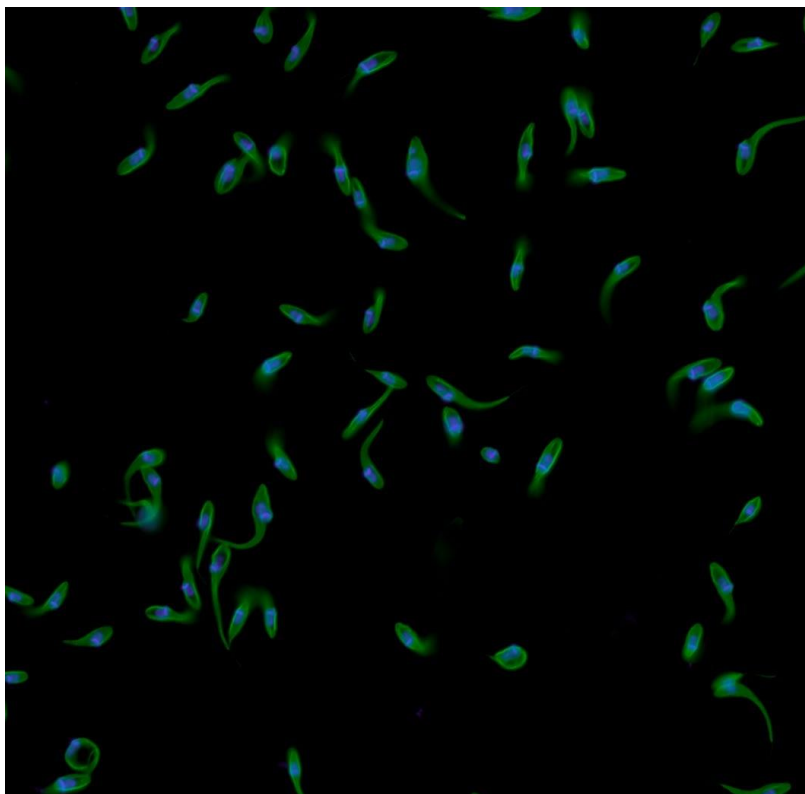


FIGURA 4. Microscopia de fluorescencia de la línea celular mNeonGreen-Snf7/Vps32 de *T. brucei* en *TrypTag*. Vps32 fue marcada con la proteína fluorescente mNeonGreen (Shaner et al., 2013) en su N-terminal mediante *tag* endógeno. De esta manera, Snf7/Vps32 se observa marcada en color verde entre el núcleo y kinetoplastos marcados con DAPI (violeta). Según esta base de datos, tal localización es compatible con endosomas.

Los cultivos TcVps32pTREX fueron evaluados mediante microscopia de fluorescencia y confocal marcando las células con el anticuerpo anti-tubulina, lo cual permitió la observación de la morfología atípica: células redondeadas, células que no habían completado la división celular y células con prolongaciones atípicas (**FIGURA 5**). Asimismo, la tinción con DAPI nos permitió revelar la presencia de números atípicos de núcleos (N) y kinetoplasto (K). Este resultado fue contrastado con la observación de los cultivos pTREX con el objetivo principal de evaluar las características morfológicas de los parásitos y así descartar que lo observado en los cultivos TcVps32pTREX no fuese consecuencia del vector. Tal como se puede apreciar, los cultivos transfectados únicamente con el vector presentaron características morfológicas típicas: 1N1K (1 núcleo-1 kinetoplasto) y un único flagelo (**FIGURA 6**).

A.



B.

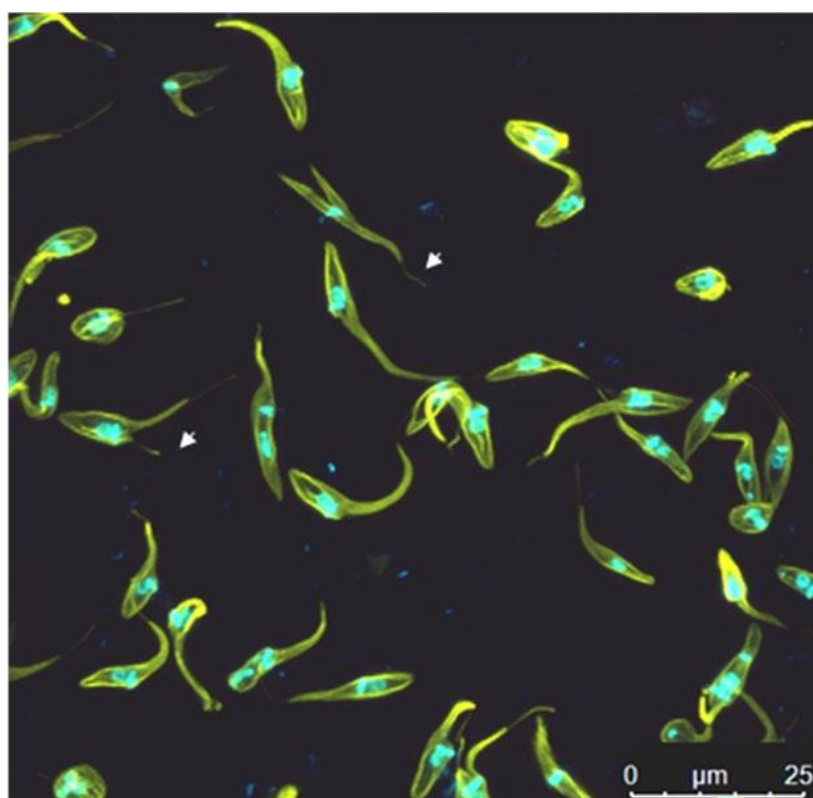


FIGURA 5. Evaluación de la morfología celular. A. Cultivos pTREX observado mediante microscopia de fluorescencia. B. Microscopia confocal de la línea celular TcVps32pTREX. Morfología celular,

número y largo aberrante de flagelos. Las flechas blancas indican los flagelos que pareciera se prolongan más allá de la membrana plasmática. Las células fueron teñidas con DAPI e incubadas con el anticuerpo anti-tubulina para marcar el cuerpo de la célula.

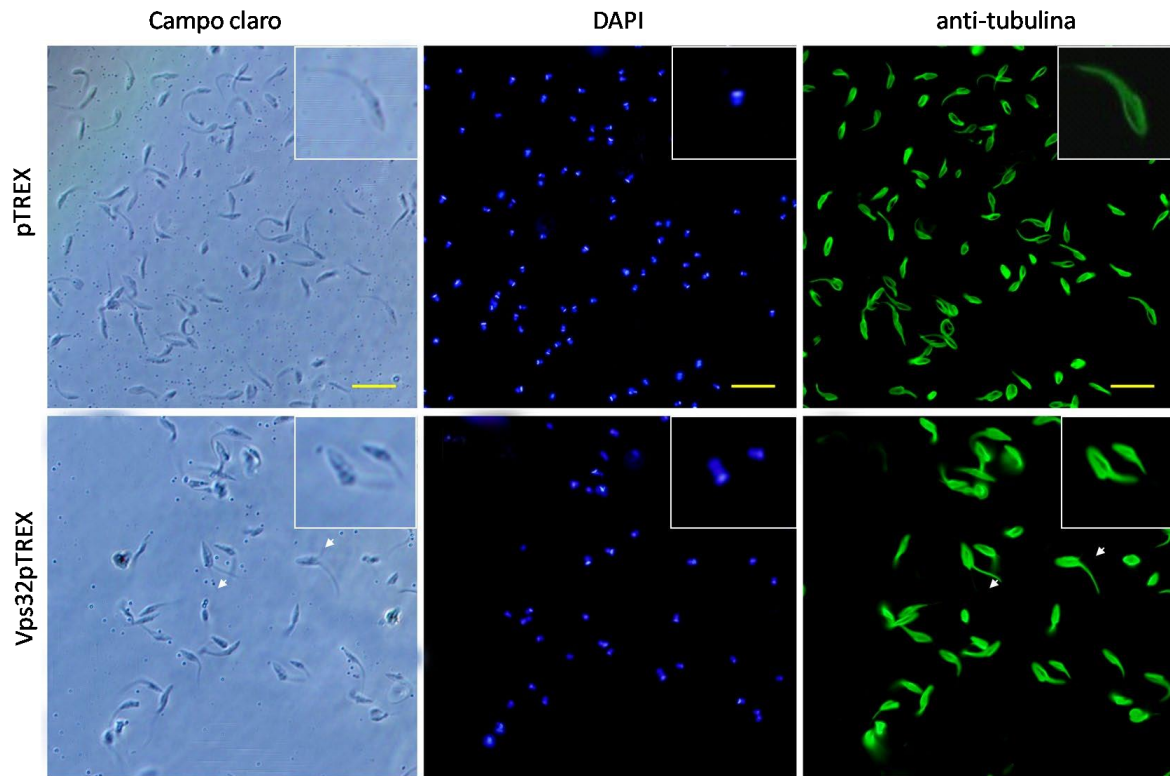


FIGURA 6. Evaluación de cultivos pTREX y TcVps32pTREX. Las células fueron incubadas con el anticuerpo anti- tubulina (verde) para evidenciar la morfología celular y teñidas con DAPI (azul) para evidenciar el contenido de DNA. En pTREX se pueden observar células de morfología atípica que posee un flagelo y un núcleo y kinetoplasto. Por el contrario, las células TcVps32pTREX poseen, en algunos casos, dos flagelos (flechas blancas). Asimismo, en estos cultivos se evidencian células con contenido aberrante de DNA (magnificación DAPI).

Constructos HA-TcVps32pRIBOTEX

Tal como se ha mencionado, la proteína Vps32 posee la capacidad de alternar entre estados conformacionales a través de la regulación de la CTR. Por lo tanto, esta proteína puede encontrarse en el citosol como monómero y como polímero cuando se activa. Ya que fue de nuestro interés entender cuál sección específica de la CTR que se encontraría implicada en esta regulación en este organismo, se generaron distintos constructos HA-TcVps32, manteniéndose la etiqueta HA en la NTR e involucrando distintas secciones de la CTR (**FIGURA 6**):

- HA-Δ5y6LTcVps32pRIBOTEX, constructo abarcativo de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de la NTR; y $\alpha 4$ de la CTR. En este caso, los efectos que podrían evidenciarse se corresponderían a la ausencia de las hélices $\alpha 5$, $\alpha 6$ y el *Linker 2* de la CTR.
- HA-Δ6LTcVps32pRIBOTEX, compuesto por las hélices de la NTR y las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ de la CTR. En este caso, los efectos evidenciados se corresponderían con la ausencia del *Linker 2* y la hélice $\alpha 6$ de la CTR.
- HA-Δ6TcVps32pRIBOTEX constructo compuesto por las hélices de la NTR y las hélices $\alpha 4$, $\alpha 5$ y el *Linker 2*(CTR). En este caso, la hélice evaluada sería la $\alpha 6$.

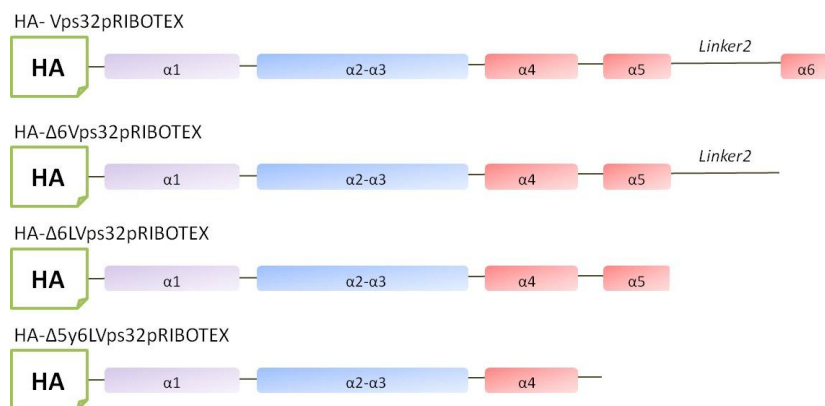


FIGURA 6. Constructos HA-TcVps32pRIBOTEX. Se llevaron a cabo tres constructos HA-TcVps32pRIBOTEX, las cuales se distinguen entre sí por el contenido diferencial de las hélices α de la CTR. La etiqueta de hemaglutinina (HA) se dispone en la NTR y cada una de las hélices se encuentra coloreada según su punto isoeléctrico (pI), de manera que, las hélices α de la CTR se observan en rojo por sus características ácidas y las hélices α de la NTR en azul por su pI básico y violeta por su pI neutro.

Nuevamente, luego de transfectar parásitos de la cepa Y en estadio epimastigote, en todos los casos se obtuvieron densidades celulares muy bajas que no resistían los repiques habituales. Es decir, todos los cultivos mostraron dificultad en su capacidad proliferativa. De hecho, el cultivo HA-Δ6TcVps32pRibotex, nunca presentó una capacidad proliferativa normal y fue un cultivo perdido luego de una semana *post* selección.

Con las mismas limitaciones que para los cultivos HA-TcVps32pRIBOTEX, se procedió a evaluar la homogeneidad y la calidad de los cultivos transgénicos mediante microscopia de fluorescencia y, tal como se esperaba, se observaron cultivos heterogéneos respecto a la marcación de la etiqueta HA. Es así como aproximadamente entre una y tres células por

campo presentaban marca y la misma era muy difusa. De esta manera, el porcentaje de células presentando la marca HA en el cultivo HA- Δ 5y6LTcVps32pRIBOTEX fue del 19% y del 3% para HA- Δ 6LTcVps32pRIBOTEX.

Aquellos parásitos que presentaron la marca de la etiqueta HA, lo hacían en su citoplasma y se observaba distribuido en torno al núcleo y al kinetoplasto. Esto fue evidente tanto en los cultivos HA- Δ 6LTcVps32pRIBOTEX como en HA- Δ 5y6LVps32pRIBOTEX, cultivo en el cual, asimismo, la marca se vio localizada a lo largo del flagelo (**FIGURA 7 y 8**). Esta localización es notoria respecto a la que habíamos registrado anteriormente en los cultivos HA-TcVps32pRIBOTEX y más aún, según lo registrado en *TrypTag* (**FIGURA 3 y FIGURA 4**). Es importante destacar que fue dificultoso poder obtener imágenes de campo claro significativas para la observación de la morfología de los parásitos debido a la afectación de los cultivos en relación con su viabilidad. Esto se observa de una manera más clara en la **FIGURA 7**, donde se observan parásitos con morfologías aberrantes, flagelos cortos y prolongaciones anormales semejantes a flagelos. Estas estructuras han sido reportadas previamente y, de hecho, son compatibles con las que se definieron como “plasmanemas” y luego como “nanotubos de membrana” al silenciar la expresión de TbVps36, proteína miembro de ESCRT-II (Eliaz et al., 2017b; Kauffman & Group, 1969).

Teniendo en cuenta las dificultades atravesadas con todos los cultivos sobreexpresantes de TcVps32 de *T. cruzi*, aunque escasos, consideramos que los resultados hasta aquí obtenidos fueron significativos. No sólo por constituir evidencia funcional inicial en este modelo, sino también por haber brindado el sustento necesario para reorientar estratégicamente el estudio hacia *T. brucei*. En este organismo filogenéticamente relacionado, y más favorable para estudios moleculares, los hallazgos iniciales en *T. cruzi* actuaron como plataforma y complemento para avanzar con un enfoque experimental más versátil a la hora de investigar.

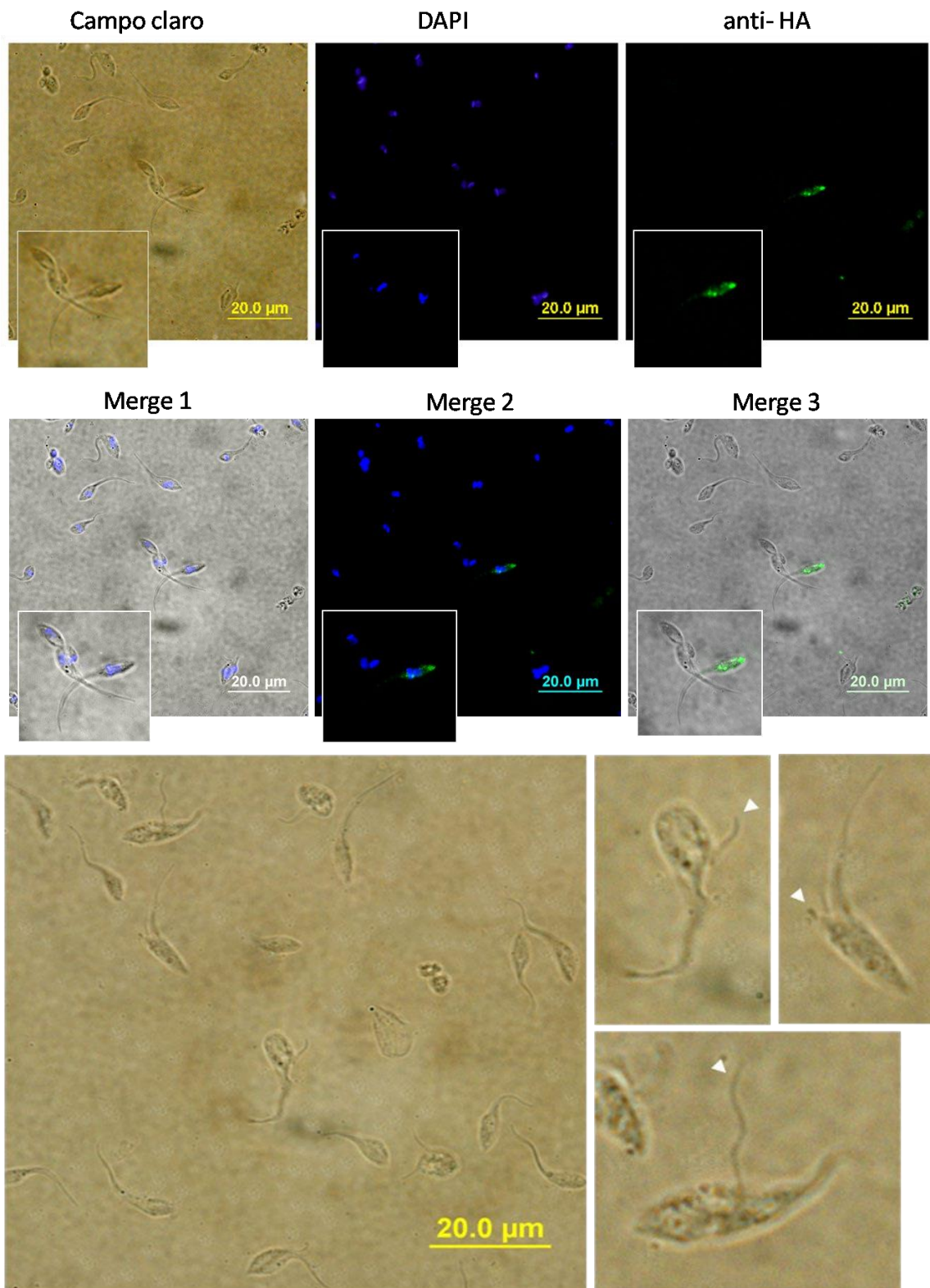
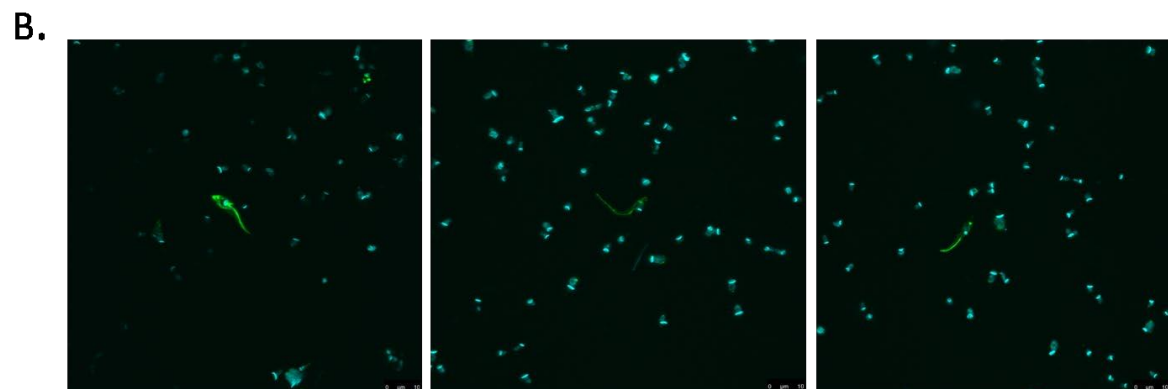
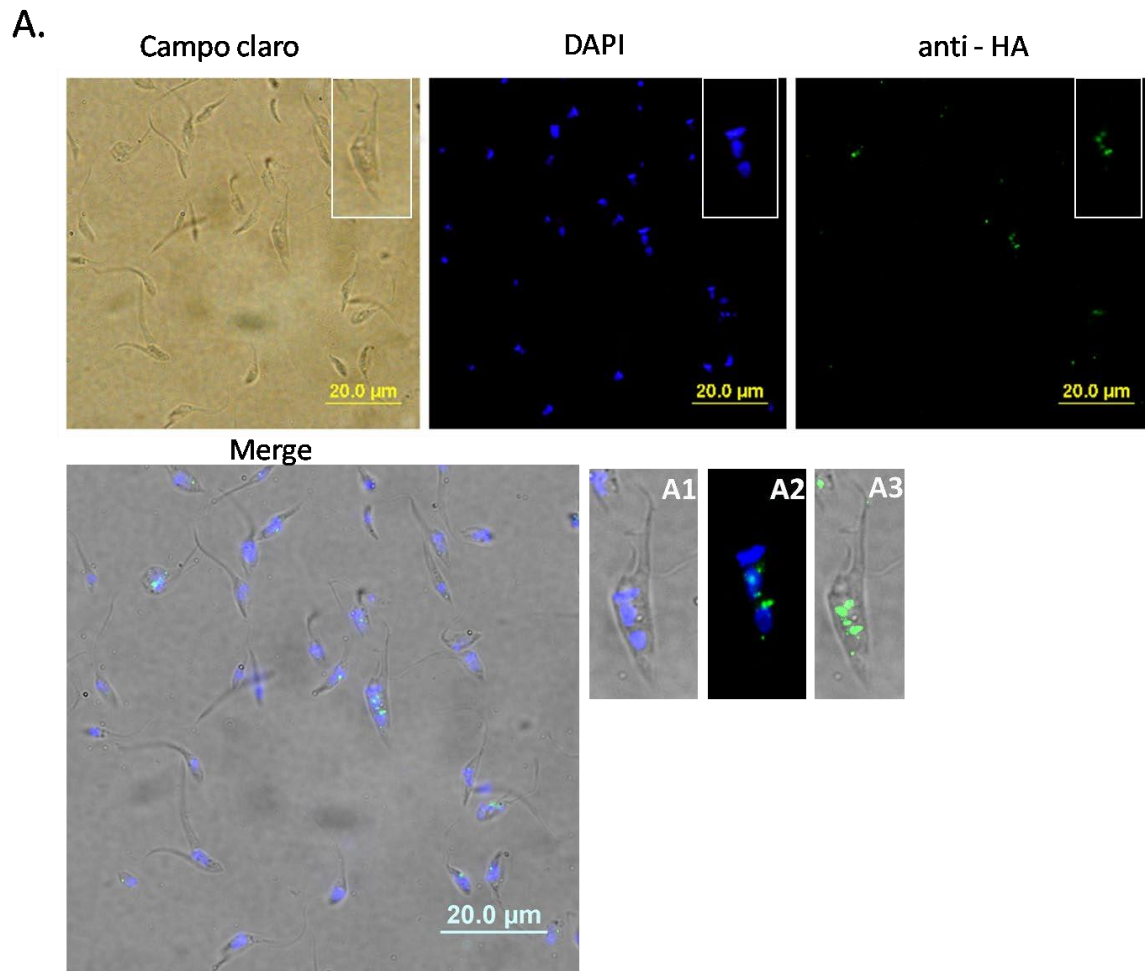


FIGURA 7. Microscopia de fluorescencia de cultivos HA-Δ6LTcVps32pRIBOTEX. Las células fueron teñidas con DAPI para la marcación de DNA (azul) e incubadas con el anticuerpo anti-HA (verde). En

estos cultivos, se observa un número reducido de células con la marca HA de la proteína en su citoplasma celular. Esta marca se localizó entre núcleo y kinetoplasto. Asimismo, las células que mostraron la marcación también poseen morfología aberrante y exhiben prolongaciones atípicas compatibles con flagelos cortos y nanotubos (flechas blancas). Merge 1: superposición de campo claro y DAPI. Merge 2: superposición de anti-HA y DAPI. Merge 3: superposición campo claro y anti-HA.



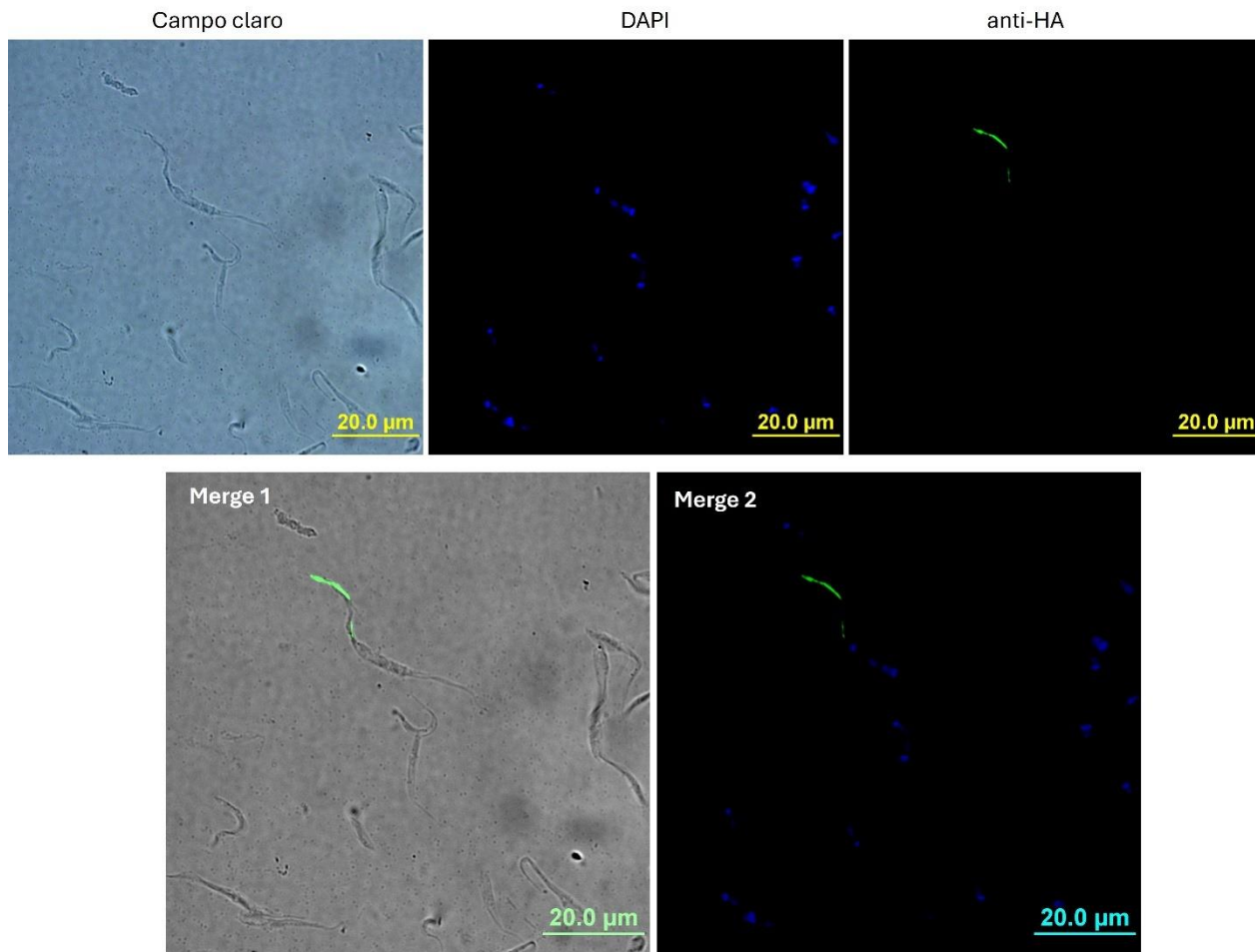


FIGURA 8. A. Microscopia de fluorescencia de cultivos HA- Δ 5y6LTcVps32pRIBOTEX. En estos cultivos, se pueden observar células con contenido aberrante de DNA (azul) y la marca HA de la proteína en el citoplasma celular, entre núcleo y kinetoplasto. **B. Microscopía confocal de HA- Δ 5y6LTcVps32pRIBOTEX.** La marca correspondiente a HA- Δ 5y6LTcVps32 se extiende llamativamente hacia el flagelo y se focaliza en esta estructura. Es notable esta ubicación de la marca ya que no se había registrado en otros cultivos. En este caso también el número de células con marca HA es mínimo (1 célula por campo). Las células fueron teñidas con DAPI para la marcación de DNA (azul) e incubadas con el anticuerpo anti-HA (verde). Merge 1: superposición campo claro y anti- HA. Merge 2: superposición anti-HA y DAPI.

2. TbVps32 de *Trypanosoma brucei* estadio procíclico (Procyclic form o PCF)

Hasta la fecha hay reportes de cinco proteínas ESCRT caracterizadas en *T. brucei*: las proteínas TbVps23 y TbVps28 (ESCRT-I), la ATPasa TbVps4 responsable del desmontaje de los complejos terminales ESCRT-III, la proteína TbVps24 (ESCRT-III) y la proteína TbVps36 (ESCRT-II). Las proteínas TbVps23 y TbVps28 han sido caracterizadas funcionalmente vinculándolas con el

transporte vesicular hacia el lisosoma, ya que se vieron asociadas a compartimentos endocíticos tempranos y lisosomas, ubicados en la parte posterior de la célula entre el núcleo y kinetoplasto (Silverman et al., 2013). Curiosamente, esta ubicación y el patrón citoplasmático observado resulta similar a los resultados obtenidos en *T. cruzi*, e incluso compatible con la distribución de TbVps32 de *T. brucei* reportada por la base de datos *TrypTag* (<http://tryptag.org/>). De manera que, aunque preliminares y carentes de referencias bibliográficas previas, los resultados obtenidos respecto a TcVps32 de *T. cruzi* parecieron responder a un “patrón”, fácilmente observable, de la familia ESCRT. De esta manera y alentados por toda la evidencia disponible sobre las proteínas ESCRT en estos organismos, abordamos el estudio de TbVps32 de *T. brucei*. Para ello, valiéndonos de la versatilidad molecular de este organismo, se llevaron a cabo dos estrategias que conllevaron a efectos opuestos y extremos: el silenciamiento de la expresión génica y la sobreexpresión proteica. Las complicaciones que afrontamos durante los ensayos de sobreexpresión constitutiva de TcVps32 de *T. cruzi* (**Resultados, Caracterización funcional de TcVps32 de *T. cruzi***), allanaron el camino hacia estrategias más exigentes de control sobre los procesos y sobre los efectos generados, de manera de preservar la viabilidad de las células. Por lo tanto, las estrategias aplicadas en *T. brucei* involucraron sistemas inducibles, los cuales, además de exhibir los elementos comunes de los vectores de expresión, incluían un promotor modulable por Tetraciclina.

A continuación, se detallarán los resultados obtenidos de cada una de las estrategias abordadas.

2.1 Estudio funcional de TbVps32 mediante Silenciamiento por RNAi

Para investigar el rol funcional de TbVps32, diseñamos una estrategia de silenciamiento génico mediante RNAi. Para ello, la secuencia genómica de TbVps32 fue insertada en la base de datos TrypanoFAN (<http://trypanofan.bioc.cam.ac.uk/trypanofan/main/>). A través de esta herramienta, fue seleccionada una secuencia génica específica de tamaño de 405 pb que funcionaría como *target* del RNAi y para el cual se diseñaron los *primers* correspondientes. Posteriormente, el producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T-Easy y, tras la digestión

con ambas enzimas de restricción, el producto de PCR fue ligado al vector p2T7-177 (Wickstead, Ersfeld et al. 2002), el cual posee un promotor inducible por Tetraciclina y el cual se integra en la región repetida de 177 pares de bases de los minicromosomas. Posteriormente, el constructo resultante se linealizó con NotI y los parásitos de la cepa 29-13 en estadio procíclico (PCF) fueron transfectados con esta construcción mediante electroporación. Luego de este procedimiento, los transfectantes fueron seleccionados con el antibiótico zeocina durante cuatro semanas, momento en el cual se obtuvieron líneas celulares estables (**Técnicas con parásitos, Materiales y métodos**).

La línea RNAiTbVps32 fue evaluada en primera instancia en relación con su capacidad proliferativa, para lo cual se procedió a la construcción de curvas de crecimiento. Las mismas consisten en la medición diaria y durante 7 días de la densidad celular de los cultivos tratados con Tetraciclina (Tet+) y de los no tratados (Tet- o control). El comportamiento de los cultivos RNAiTbVps32 se puede observar en las curvas de crecimiento (**FIGURA 1**). Las diferencias de densidades celulares entre los cultivos Tet+ y Tet- comenzaron a observarse a partir de las 48 horas (día 2), siendo más evidente a las 72 horas (día 3), momento en el cual se procedió a la dilución de los cultivos en medio fresco a una concentración inicial de 5×10^5 células/mL. Se puede observar que, a partir de las 72 horas y luego de la dilución, los cultivos Tet+ no lograron incrementar su densidad celular, hecho que se extendió hasta el día 7 de la curva (**FIGURA 1**). Por el otro lado, los cultivos Tet- mantuvieron su capacidad proliferativa normal, alcanzando valores de 4×10^7 células/mL al día 7 de la curva de crecimiento, aún luego de haber sido sometidos a la dilución en el día 3. De esta manera, estos resultados podrían sugerirnos que TbVps32 es esencial para la supervivencia del parásito, ya que el silenciamiento de TbVps32 genera un efecto detrimental en la capacidad proliferativa y la viabilidad del parásito.

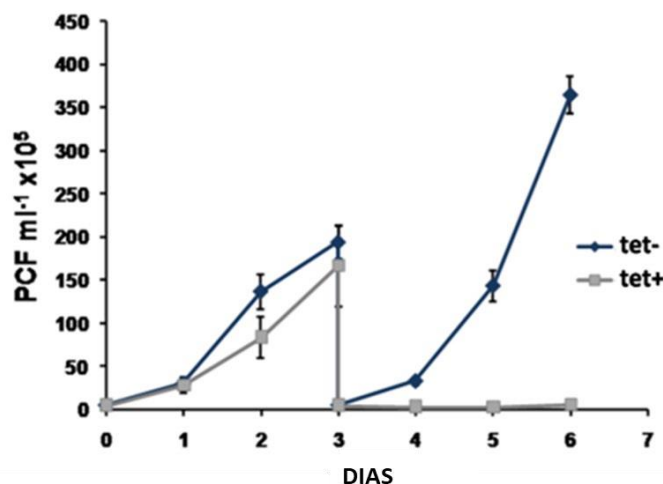


FIGURA 1. TbVps32 es esencial para el crecimiento de *T. brucei* estadio procíclico (PCF). La línea celular RNAi TbVps32 se cultivó con (Tet+) o sin (Tet-) 1 µg/mL de Tetraciclina para inducir la expresión del RNAi y el crecimiento se controló diariamente mediante recuento celular con cámara de Neubauer. Los datos son medias ± SEM (n =3).

Simultáneamente, ya que era imprescindible confirmar el silenciamiento de TbVps32, se tomaron muestras de ambos cultivos a las 48 horas y 72 horas para confirmar el silenciamiento mediante RT-PCR (**FIGURA 2**). Utilizando la actina como control de carga se puede observar que todas las células presentaron los mismos niveles de transcripción. Sin embargo, en los cultivos Tet- a las 48 horas y 72 horas, se destacó una banda ubicada entre los 350-500 pb correspondiente al mRNA de TbVps32, que resultó indetectable en los cultivos Tet+ a las 72 horas. Por lo tanto, en estas células se evidenció que el nivel de TbVps32 es indetectable a las 72 horas de inducción con Tetraciclina, lo cual nos confirma el silenciamiento de la misma (**FIGURA 2**).

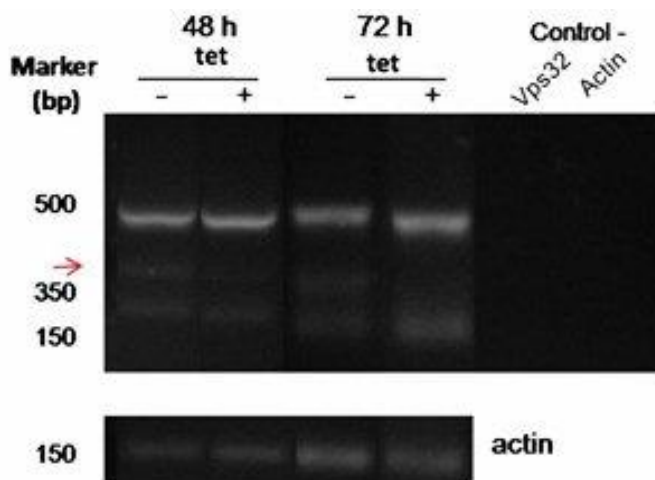
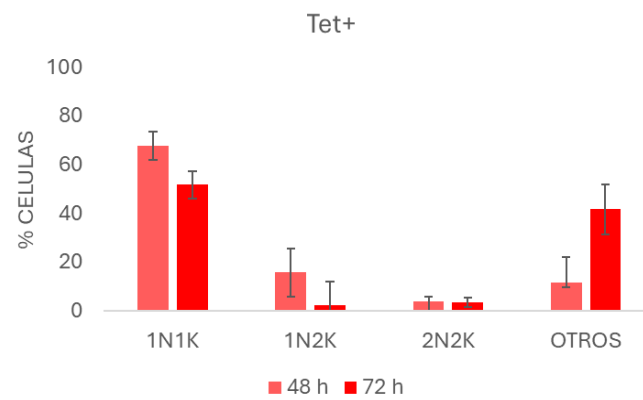
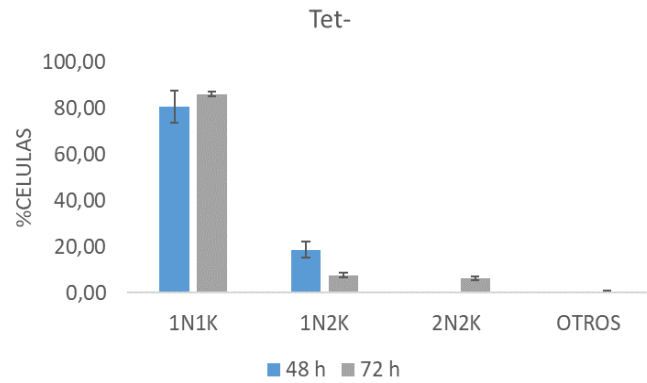


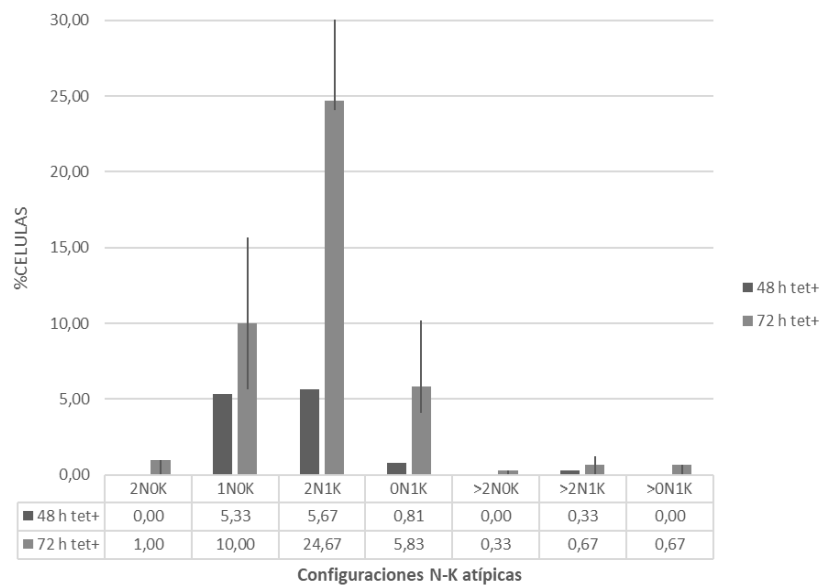
FIGURA 2. Confirmación del silenciamiento génico de TbVps32 por RT-PCR. El ARN se extrajo de las células incubadas en presencia o ausencia de 1 µg/mL de Tetraciclina durante tres días y se analizó mediante RT-PCR y se confirmó el silenciamiento de TbVps32 a las 72 horas. Punta de flecha roja: banda de 405 pb.

Dado que Vps32 en *S. cerevisiae* y *H. sapiens* desempeña un papel central en el proceso de abscisión durante la citoquinesis (Capalbo et al., 2016; Carlton et al., 2012) y considerando los efectos observados en las curvas de crecimiento, inicialmente se evaluó el impacto del silenciamiento de TbVps32 en el ciclo celular mediante el análisis de los fenotipos celulares, con especial atención a las configuraciones núcleo-kinetoplasto (N-K). Para ello, el contenido de DNA de ambas estructuras subcelulares fue teñido con DAPI y analizado mediante microscopía de fluorescencia (**FIGURA 3**). Posteriormente, se llevó a cabo la contabilización de cada una de las configuraciones tanto para los cultivos Tet- como Tet+.

A.



B.



C.

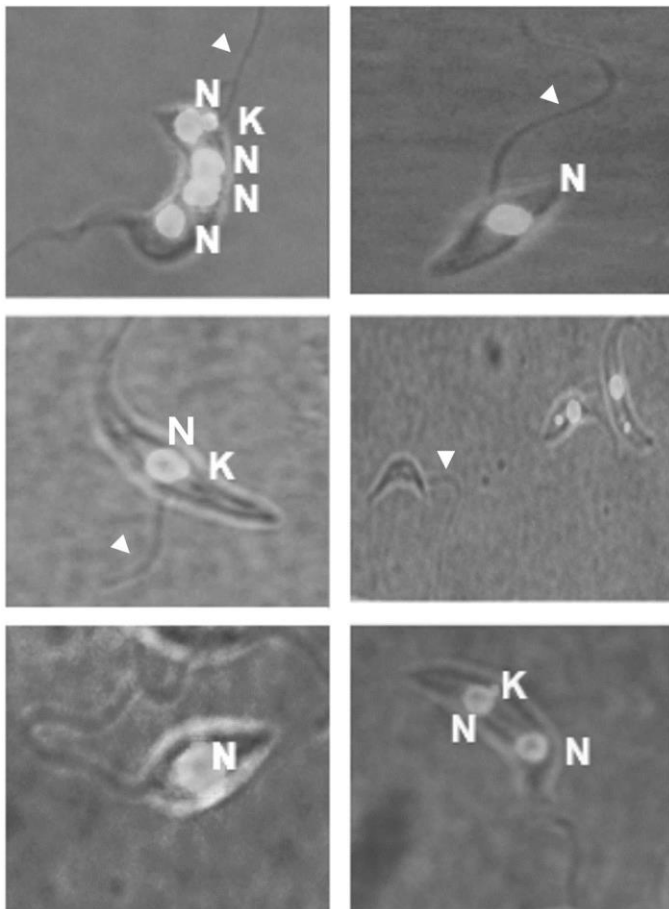
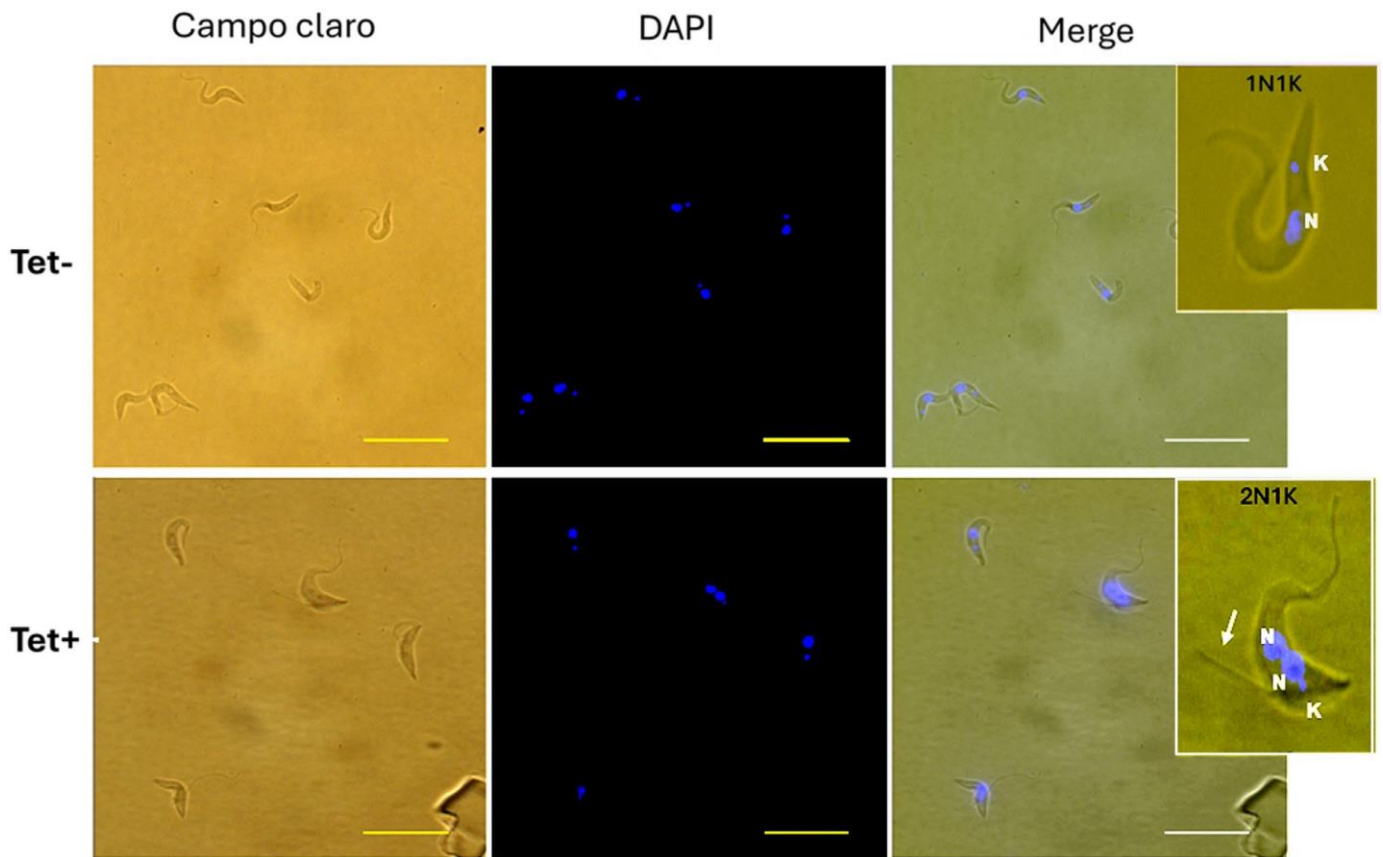


FIGURA 3. Análisis y cuantificación de fenotipos de N-K. El silenciamiento de TbVps32 mediante RNAi produce configuraciones atípicas N-K. **A.** Cultivo de parásitos de 48 y 72 horas no tratados con Tetraciclina (Tet-) y tratados (Tet+) fueron incubados con DAPI para la marcación de ambas estructuras con contenido de DNA. **B.** En el análisis fenotípico de configuraciones anormales núcleo-kinetoplasto, la principal configuración detectada fue 2N1K tanto a las 48 horas como a las 72 horas. Los datos se presentan como porcentajes de células de un número total de 200 células de tres experimentos de inducción independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (SEM). **C.** En cultivos de 72 horas de inducción con Tet, se observaron fenotipos predominantes 2N1K, 1NOK y células con prolongaciones (flechas blancas). Núcleo (N), kinetoplasto (K). Barra de escala: 10 μ m.

Tal como se puede apreciar, en los cultivos Tet⁻ se observaron configuraciones N-K normales a lo largo de los 7 días de la curva de crecimiento (1N1K, 1N2K, and 2N2K). Sin embargo, en los cultivos Tet⁺ se observó principalmente la reducción del porcentaje de células 1N1K y el incremento de células con configuraciones atípicas tanto a las 24 horas y las 72 horas post-tratamiento (**FIGURA 2**). Dentro de este grupo, 2N1K fue el fenotipo aberrante predominante. De manera que, hasta aquí, los resultados fueron indicativos que el silenciamiento de TbVps32 afectaba negativamente alguna de las etapas del ciclo celular de *T. brucei* PCF.

Adicionalmente, algunos parásitos con fenotipo N-K anormal presentaron morfología aberrante y largos filamentos emergiendo de la parte posterior del cuerpo celular, tal cual habíamos observado en los cultivos de HA-TcVps32pRIBOTEX de *T. cruzi* (**FIGURA 3B**), y que parecían corresponderse con nanotubos. Adicionalmente, es destacable la observación de células sin contenido de DNA (zoide) (**FIGURA 3C**).

2.1.1 Silenciamiento de TbVps32 y evaluación del ciclo celular.

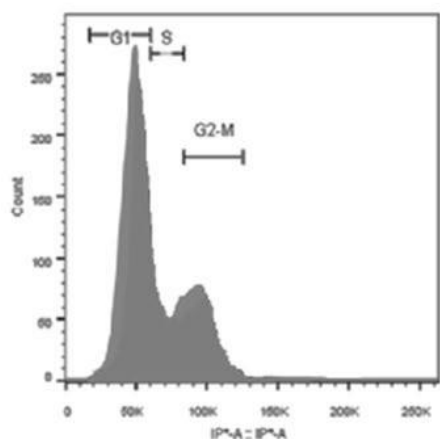
El efecto del silenciamiento de TbVps32 sobre la capacidad proliferativa de los cultivos y los fenotipos N-K aberrantes observados, nos alentaron a evaluar el rol de TbVps32 durante el ciclo celular. Para ello, primeramente, nuestro objetivo se centró en evaluar el perfil y la proporción celular de cada fase del ciclo del cultivo RNAiTbVps32 sin sincronizar, ya que, de haber alguna falla grosera, esta podría ser fácilmente visualizada en el perfil. Comúnmente, el perfil del ciclo celular muestra una mayoría numérica de células en fase G1 y un menor número de células con doble contenido de DNA, que se correspondería con la fase G2/M. Asimismo, entre ambos picos se evidencia una meseta que se corresponde con la proporción de células cursando la fase S del ciclo (**FIGURA 4**).

Para este análisis, los cultivos asincrónicos RNAiTbVps32 fueron tratados con Tetraciclina durante 72 horas, colectándose las muestras a las 24 horas, 48 horas y 72 horas. Luego, las células fueron incubadas con Ioduro de Propidio (IP) y finalmente, la progresión del ciclo fue evaluada mediante citometría de flujo. Tal como se puede observar en la **FIGURA 4**, los cultivos RNAiTbVps32 Tet⁺ se encontraron desplazados levemente hacia la izquierda respecto a los Tet⁻, pero manteniendo el perfil normal del ciclo. Al evaluar el porcentaje de células de cada fase celular de los tres tiempos ensayados, se observó que no hay diferencias significativas

entre los cultivos Tet- y Tet+, lo cual fue sorpresivo debido a los fenotipos aberrantes observados por microscopia de fluorescencia previamente (**FIGURA 3B**).

A.

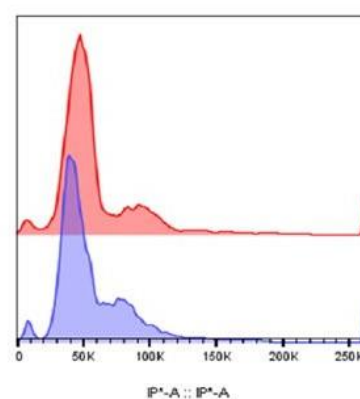
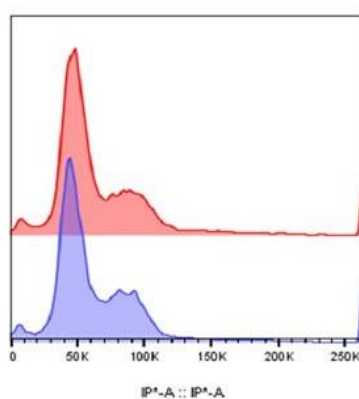
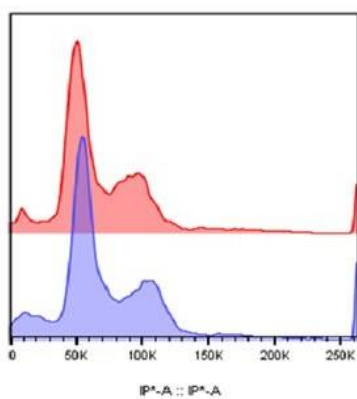
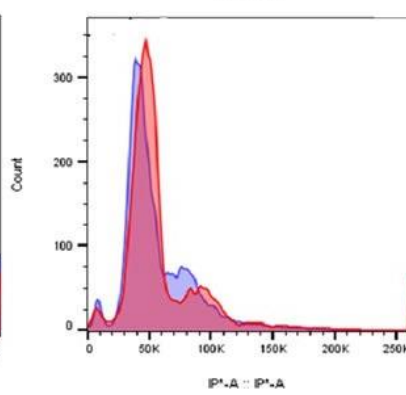
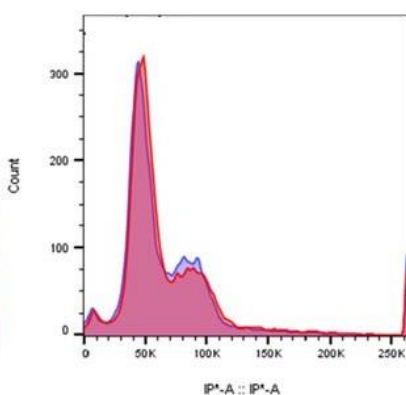
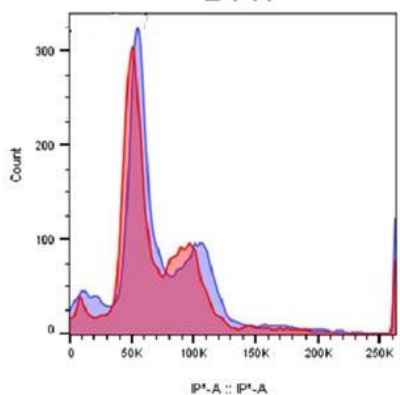
PERFIL CICLO CELULAR



24 H

48 H

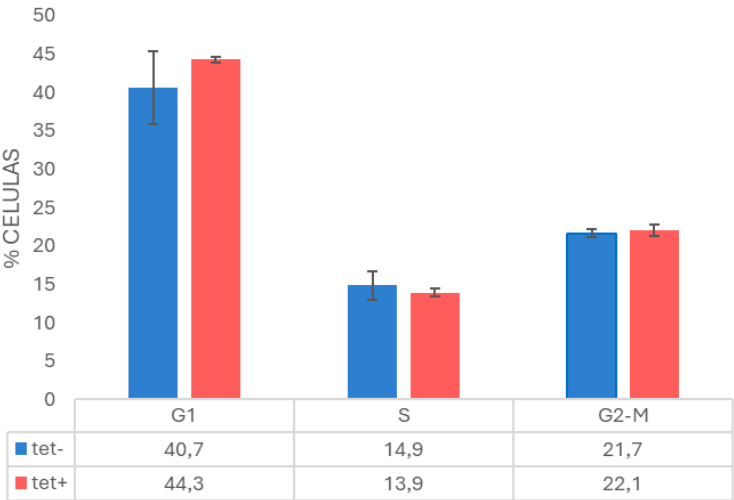
72 H



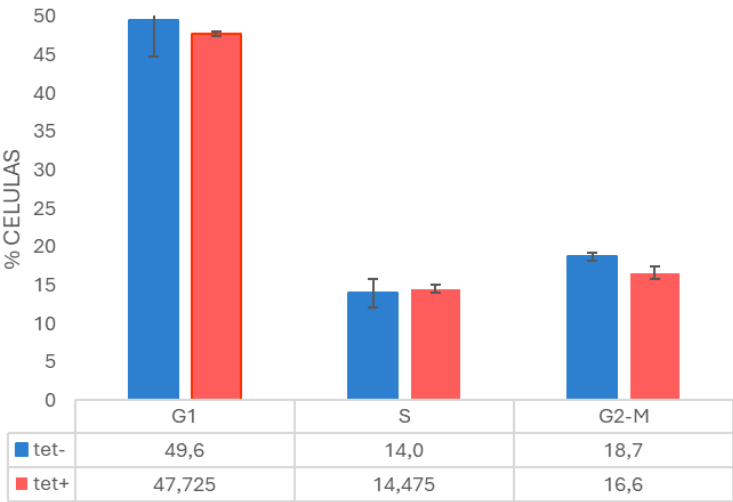
● TET- ● TET+

B.

24 HORAS



48 HORAS



72 HORAS

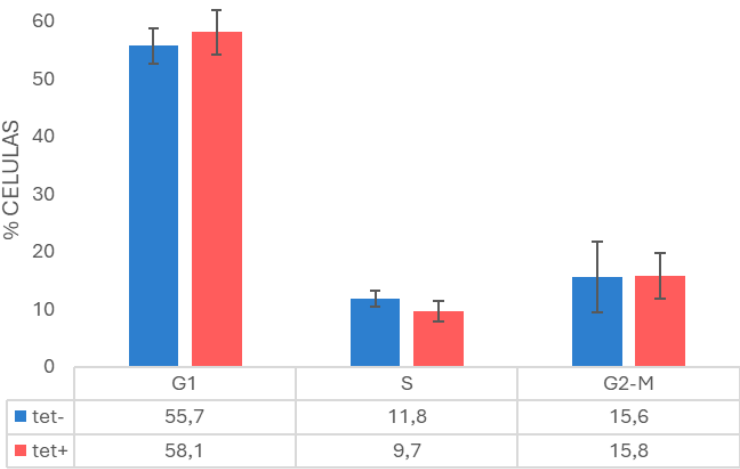
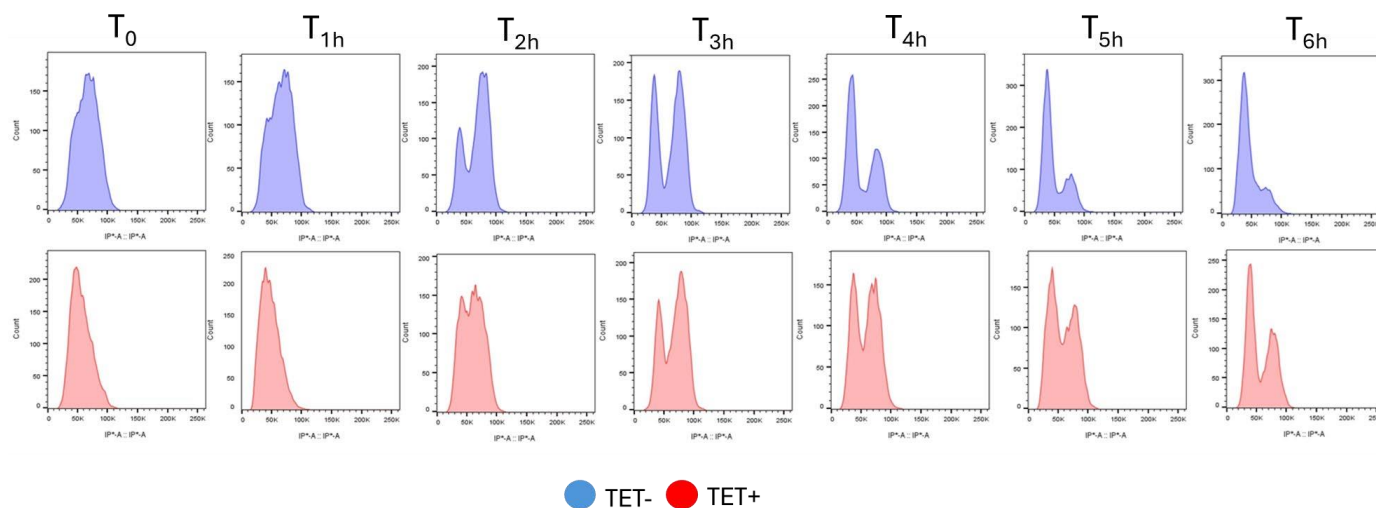


FIGURA 4. Cultivos de la línea celular RNAiTbVps32 PCF sin sincronizar. Se tomaron muestras de cultivos Tet+ y Tet-, en ambos casos sin sincronizar, a las 24 horas, 48 horas y 72 horas. **A.** En el perfil del ciclo celular (izquierda arriba) se reconocen las fases G1, S y G2-M delimitadas. Estas fases fueron evaluadas globalmente a través de los perfiles obtenidos a los distintos tiempos en ambos cultivos, observándose mínimas diferencias entre ellos. **B.** Asimismo, las fases del ciclo fueron evaluadas cuantitativamente a través del Porcentaje (%) de células de cada subpoblación. Estos resultados son el resultado de tres experimentos independientes. Los datos son medias $\pm$ SEM (n =3).

A partir de este resultado, nuestro objetivo se focalizó en el análisis detallado de la progresión del ciclo celular, siempre teniendo en cuenta que la división nuclear es un evento independiente de la división del kinetoplasto y que ambos eventos se desarrollan en etapas distintas del ciclo. Para ello, los cultivos RNAiTbVps32 fueron tratados con Tet durante 48 horas con el objetivo de evaluar el comportamiento de los cultivos a las 72 horas, ya que, a este tiempo, se garantiza el silenciamiento de TbVps32 sin que las células pierdan viabilidad y sin que los consecuentes resultados lleven a interpretaciones inadecuadas y/o sesgadas. Luego del tratamiento con Tet, se procedió a la sincronización de los cultivos con Hidroxiurea (HU) durante 12 horas, droga que bloquea la síntesis de DNA y, en consecuencia, produce el arresto del ciclo celular en la fase S de *T. brucei* (Chowdhury et al., 2008; Davis Penny K et al., 2001; Galanti et al., 1994). El resultado que se encuentra detallado en la **FIGURA 5** constituye el resultado más representativo de los tres ensayos llevados a cabo de manera independiente. Cabe destacar que en todos los casos se obtuvo el mismo resultado.

A.



B.

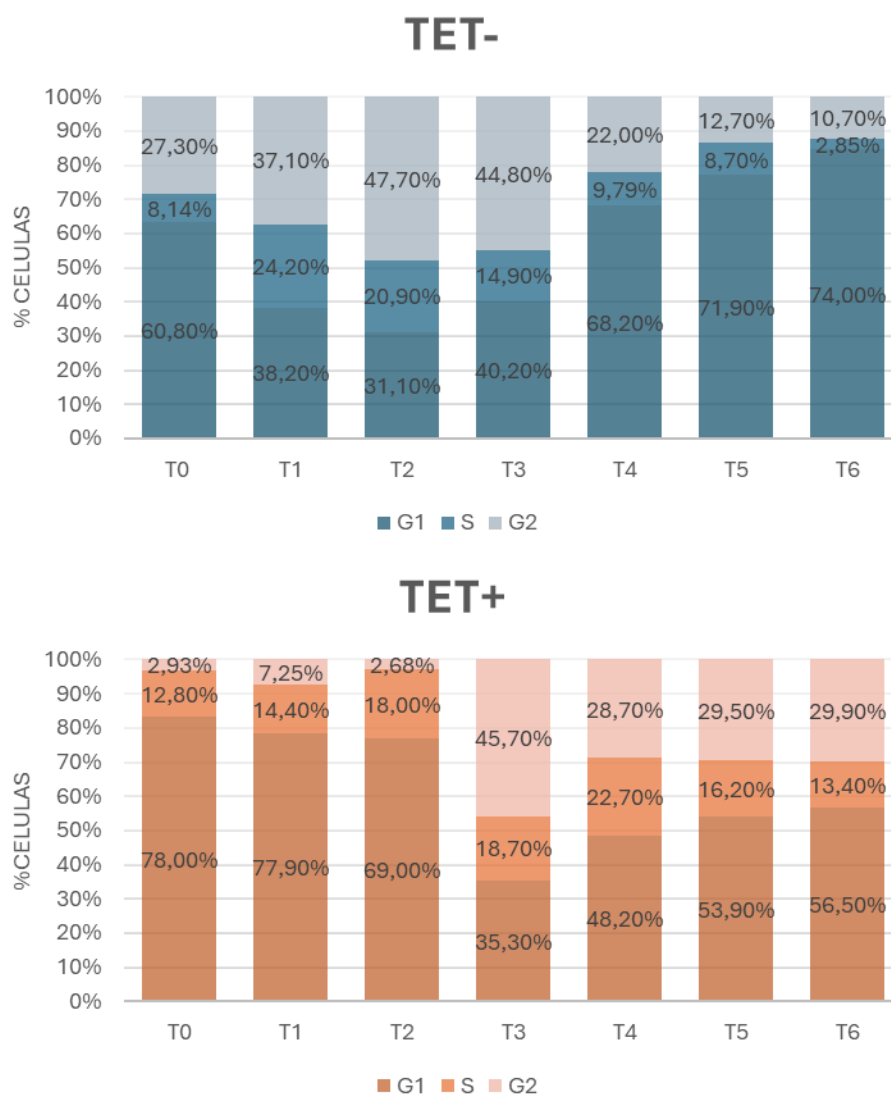


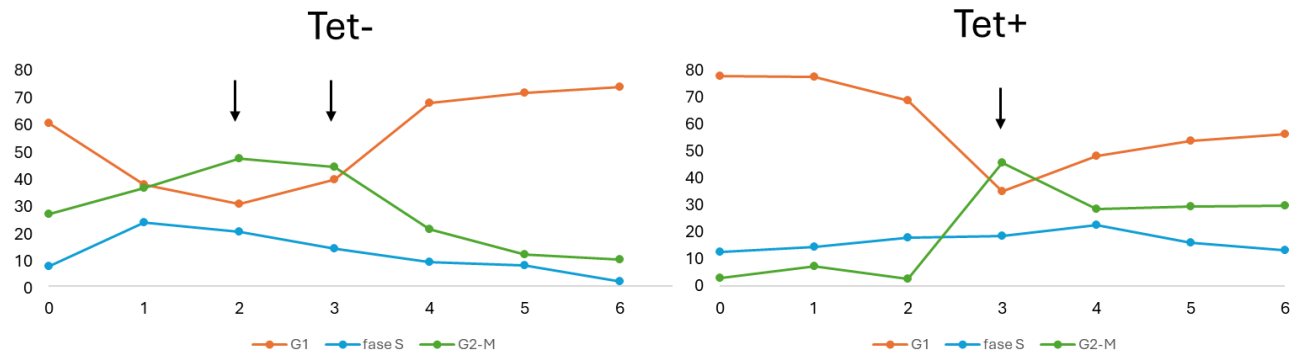
FIGURA 5. Sincronización de la línea RNAiTbVps32p2T7** PCF.** Los cultivos Tet+ y Tet- fueron tratados con Hidroxiurea (HU) durante 12 horas. Luego de ese tiempo fueron lavados y resuspendidos en medios fresco con (Tet+) o sin tratamiento con Tetraciclina (Tet-), momento que representa el tiempo inicial o cero (T_{0H}). Luego, fueron tomadas muestras cada 1 hora durante 6 horas. **A.** Progresión del ciclo celular. Al analizar los perfiles de cada uno de los cultivos, se hace evidente el retraso en la progresión de las distintas fases del ciclo celular de los cultivos RNAi**TbVps32p2T7-177** Tet+ (rojo). **B.** El retraso en la progresión del ciclo celular se ve reflejado numéricamente en el gráfico de barras que representa el porcentaje de células de cada fase del ciclo (G1, S y G2-M) a lo largo de las 6 horas.

Luego de quitar la HU del medio de cultivo y reestablecer la progresión normal del ciclo (T₀), en los cultivos control (Tet-) se observa que la progresión desde la fase S a la fase G2/M ocurre

durante las primeras dos horas (desde T_0 a T_{2H}). De manera que al tiempo T_{2H} se observa la reaparición gradual del pico de la fase G1. Contrariamente, en los cultivos Tet+, se observan cambios mínimos del perfil del ciclo entre T_0 y T_{2H} , acumulándose una gran proporción de células en fase G1 y S (**FIGURA 5**). Este comportamiento es evidente numéricamente (**FIGURA 5B**). Por lo tanto, comparando T_0 y T_{2H} , los cultivos Tet- disminuyeron a la mitad el número de células en G1 y aumentaron al doble el número en G2/M; en ese intervalo de tiempo, los cultivos Tet+ muestran una disminución de alrededor del 10% de células manteniendo de esta manera una mayoría porcentual de células en G1 ya que la variación del número de células en G2/M es mínimo. Este comportamiento indica la existencia del *delay* o retardo en la progresión del ciclo celular de los cultivos Tet+. De hecho, el mismo se hace evidente al comparar el perfil del ciclo de los cultivos Tet+ en el tiempo T_{3H} y los cultivos Tet- en el tiempo T_{2H} ; es decir, los perfiles del ciclo y los valores porcentuales de células de cada fase en ambos cultivos en esos tiempos específicos son similares (**FIGURA 5B**).

Pasadas las 3 horas de reiniciado el ciclo, en los cultivos Tet- se observan dos picos definidos: el primero correspondiente a las células que atravesaron la fase G2/M y retornan a G1, y el segundo pico se corresponde a células que progresaron desde la fase S a G2/M. En este caso, ya que los porcentajes celulares de ambas fases son similares (**FIGURA 5B**), se observan estos dos picos definidos y de casi igual altura (**FIGURA 5A**). Contrariamente, en el caso de los cultivos Tet+ a este tiempo (T_{3H}), se observan dos picos G1 y G2/M de distinta altura y grosor ya que las proporciones celulares entre fases es distinta. A este tiempo se observa no sólo mayor porcentaje de células en G2/M, sino también una considerable proporción de células en fase S (**FIGURA 5A y B**). Por lo tanto, en estos cultivos, se observa retardo en el avance del ciclo durante los tiempos T_{0H} , T_{1H} y T_{2H} , lo cual cambia drásticamente a partir de T_{3H} (**FIGURA 6**). Al respecto, comparando siempre con los cultivos Tet-, la proporción de células en G1 es menor y el porcentaje de células en la transición fase S a G2/M es mayor. Por el contrario, el comportamiento de los cultivos Tet- es totalmente distinto, ya que los mismos avanzan de manera sincrónica y sostenida desde el reinicio del ciclo (**FIGURA 6A**).

A.



B.

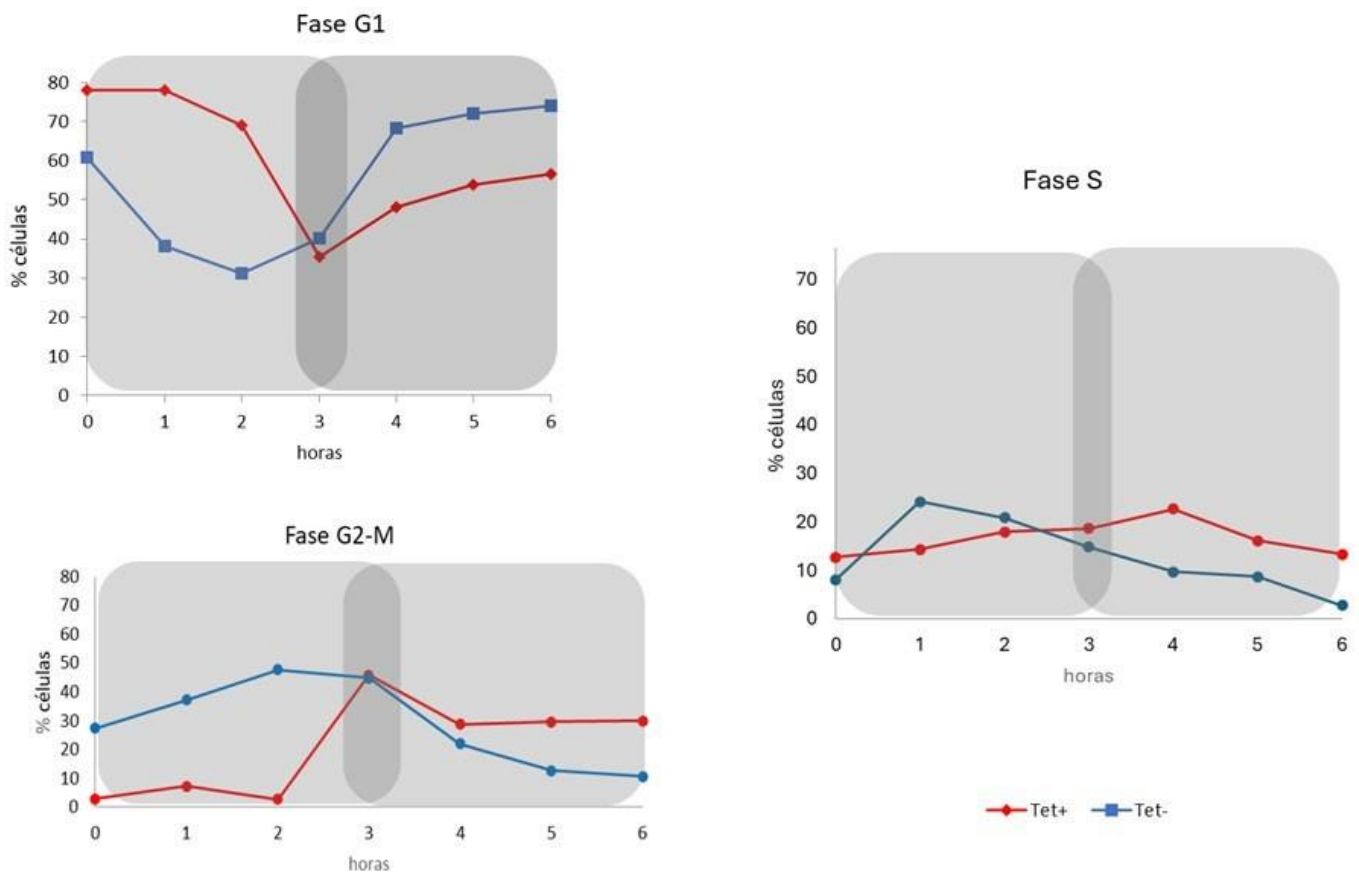


FIGURA 6. Comportamiento de los cultivos sincronizados. A. Los datos numéricos de los gráficos de barra fueron utilizados para evaluar la tendencia de los cultivos. De esta manera, se obtuvieron los gráficos de RNAiTbVps32p2T7-177 Tet- y RNAiTbVps32p2T7-177 Tet+ y se puede observar el patrón de avance del ciclo celular de ambos cultivos. A. Las flechas muestran los puntos en los cuales la proporción de células de G2-M es mayor. Mientras los cultivos Tet- poseen dos flechas, Tet+ presenta

sólo una, lo cual representa un cambio drástico de proporciones celulares. Por lo tanto, este punto es representativo de lo que globalmente se percibe como la pérdida de progresión normal del ciclo de los cultivos Tet+. **B.** Las líneas de tendencia muestran dos comportamientos de los cultivos Tet+ a partir de las 3 horas. Si bien los cultivos RNAiTbVps32 Tet+ logran completar un ciclo a las 6 horas con una proporción mayor de células en G1, se puede observar cómo esta proporción es menor a la exhibida por los cultivos Tet- y cómo la proporción de células en G2-M es mayor a la de Tet-.

A partir de las 4 horas (T_{4H}) se hace más evidente la alteración de la progresión del ciclo; específicamente se observa que es dificultoso el pasaje desde G1/S a G2-M con la consecuente acumulación de células en G2/M y un comportamiento inusual de la fase S (**FIGURA 5B y 6B**). A pesar de esta diferencia de proporciones celulares entre los cultivos Tet+ y Tet-, en la **FIGURA 6B** se observa cómo los cultivos presentan la misma línea de tendencia (comportamiento) de las fases G1 y G2-M a partir del tiempo T_{4H} .

Finalmente, las células Tet- alcanzan un perfil compatible con un ciclo celular completo a las 5 horas (T_{5H}), mientras que los cultivos Tet+ lo hacen a 6 horas (T_{6H}), momento en el que se observan las tres fases bien diferenciadas con proporción mayoritaria de células en G1 (**FIGURA 5**). A pesar de ello, el porcentaje de células de G1 de los cultivos Tet+ es inferior al de los cultivos Tet- (**FIGURA 6B**). También de manera contraria, los cultivos Tet+ exhiben mayor proporción de células en G2-M a partir de T_{4H} respecto a los cultivos Tet-.

El análisis de los perfiles del ciclo celular obtenidos mediante sincronización permitió identificar dos comportamientos claramente diferenciados en los cultivos Tet+, siendo el tiempo T_{3H} el punto de inflexión entre ambos. A partir de T_{3H} , se genera un cambio drástico de comportamiento y proporciones celulares. Ello es visible y revelado notablemente por las líneas de tendencia de ambos cultivos: en la primera parte se ve el avance totalmente desincronizado de los cultivos Tet+ en referencia a los cultivos Tet-; y en la segunda parte, también se observa el retraso de la progresión del ciclo, pero cursando un comportamiento similar al de los cultivos Tet- (**FIGURA 6B**).

En suma, los cultivos RNAiTbVps32p2T7-711 presentaron alterada la capacidad de progresión normal del ciclo celular, experimentando retardos y avances drásticos que, por lo tanto, generó poblaciones celulares de proporciones diferentes a las típicas con un incremento de

células notable en las fases S y G2/M.

2.1.2 Silenciamiento de TbVps32 y transporte vesicular

Los procesos que involucran el transporte vesicular son fundamentales para *T. brucei*, ya que es uno de los mecanismos que garantiza la adaptación y la restauración de la homeostasis durante la progresión del ciclo de vida e, incluso, durante la infección. La participación de Vps32 en el transporte vesicular ha sido caracterizado en profundidad principalmente en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. Sin embargo, también ha sido estudiado en *T. brucei* estadio sanguíneo (BSF), estudios en los cuales las proteínas ESCRT se encuentran vinculadas al transporte endocítico y a la ruta biosintética (Silverman et al., 2013; Umaer & Bangs, 2020). De hecho, de estas proteínas, TbVps23 y TbVps28 fueron observadas en asociación con endosomas tempranos y lisosomas lo cual constituye un hecho de gran relevancia ya que, según la base de datos *TrypTag* consultada oportunamente (**FIGURA 4, TcVps32 de *T. cruzi***), la proteína TbVps32 se encontraría asociada a compartimentos endocíticos. Teniendo en cuenta la evidencia bibliográfica, los resultados previos en *T. cruzi* y la importancia del transporte vesicular en estos parásitos, decidimos abordar el estudio del transporte vesicular en torno a la proteína TbVps32 de *T. brucei* PCF.

T. brucei presenta distintos estadios parasitarios, en los cuales se conservan los mismos mecanismos de transporte celular. Sin embargo, el predominio de una u otra ruta está asociado al estadio parasitario. Por ejemplo, en *T. brucei* PCF predomina la endocitosis de fase fluida mientras que en el estadio BSF, el mecanismo de transporte más predominante es la endocitosis mediada por receptor. Con el objetivo de determinar si el silenciamiento de TbVps32 de *T. brucei* PCF afecta el transporte vesicular, los cultivos Tet⁺ y los Tet⁻, fueron incubados con trazadores específicos para observar y evaluar la ruta endocítica hacia el lisosoma mediante microscopía de fluorescencia. Para evaluar nuestros cultivos RNAiTbVps32, el trazador Alexa 546-Dextrano fue el de elección ya que no sólo constituye el marcador recomendable para evaluar endocitosis de fase fluida, sino que ya había sido utilizado en nuestro laboratorio arrojando resultados significativos (Schoijet et al., 2018). Adicionalmente, los cultivos fueron incubados con el trazador FITC-Transferrina, otro trazador conocido y utilizado en nuestro laboratorio, siempre reportando buena marcación (Schoijet et al., 2018).

Si bien el mismo es utilizado en *T. brucei* BSF generalmente para evaluar endocitosis mediada por receptor, en nuestros cultivos de *T. brucei* PCF es incorporado a la célula a través de endocitosis de fase fluida.

Los trazadores presentan características químicas específicas que contribuyen a la evaluación concreta del mecanismo de transporte. Es decir, gracias a su naturaleza química dependiente de la temperatura, el trazador emprende su trayecto desde el exterior celular y luego se localiza en un compartimento subcelulares específico. De esta manera, la ruta de transporte desde que la carga es internalizada por endocitosis y transportada hasta el lisosoma, podría observarse simplemente incubando las células con el trazador a distintas temperaturas (Allen et al., 2003). Tal como puede observarse en la **FIGURA 7**, el mecanismo general contempla que, a 4°C el trazador se exhibe como un único punto cercano al kinetoplasto y al bolsillo flagelar, lo cual indica que el trazador fue internalizado desde el medio extracelular. A 12°C, sería esperable observar al trazador asociado a compartimentos endocíticos, entre el núcleo y el kinetoplasto, a mitad de camino hacia el lisosoma; y finalmente a 28°C, el trazador debería observarse como un único punto asociado al lisosoma, cercano al núcleo.

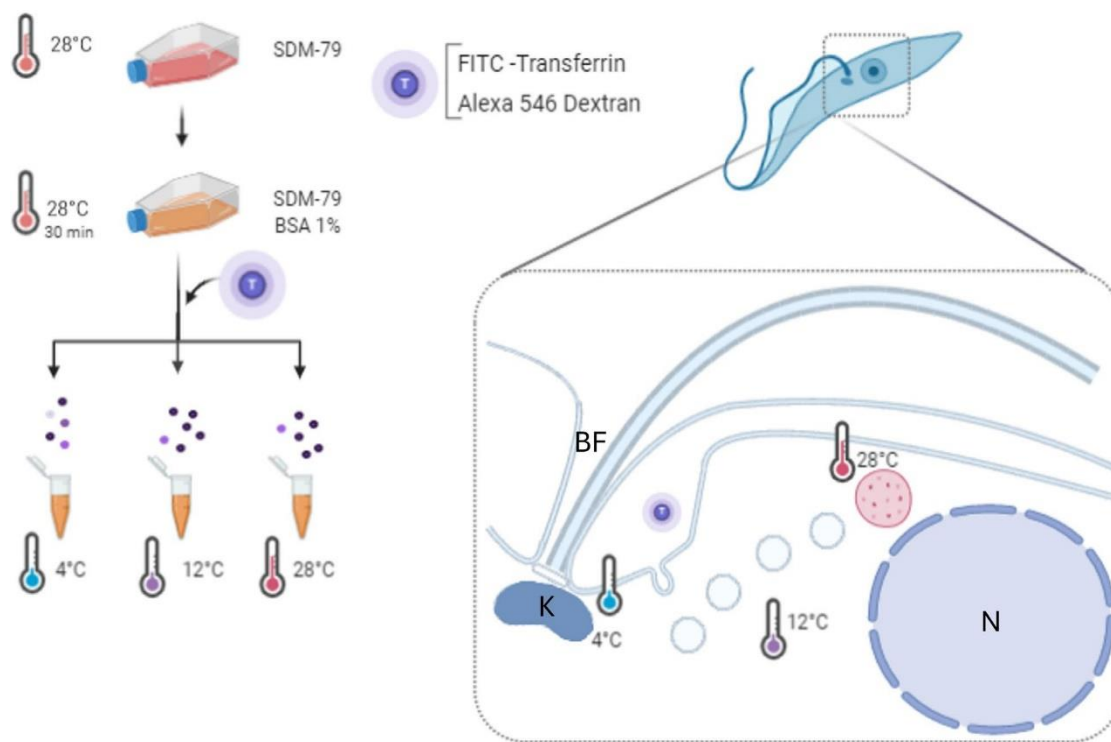


FIGURA 7. Esquema ilustrativo de los ensayos de FITC-transferrina y Alexa 546-Dextrano. El ensayo consiste en la incubación de los cultivos con el trazador correspondiente a distintas temperaturas a fin de dilucidar la ruta endocítica hacia el lisosoma. A los 4°C el marcador se dispone cercano al

kinetoplasto (K) y el bolsillo flagelar (BF). A los 12°C, el marcador se relaciona con los endosomas del sistema endocítico y finalmente, a los 28°C el marcador funciona como marcador de Lisosomas, cerca del núcleo celular (N).

De esta manera, los cultivos RNAiTbVps32 tratados con Tetraciclina durante 72 h fueron incubados con ambos trazadores, FITC-Transferrina y Alexa 546- Dextrano, a las temperaturas indicadas de manera independiente, tal como se muestra en la **FIGURA 7**. Sin embargo, sólo pudimos obtener una marcación del trazador FITC- Transferrina de intensidad considerable para su observación mediante microscopia de fluorescencia. Los resultados de esta marcación fueron los siguientes (**FIGURA 8**):

*A 4 °C se observó la internalización del trazador a través del bolsillo flagelar como un único punto cerca del kinetoplasto tanto en cultivos Tet+ y Tet- (Fig. 5A);

*A 12°C, en las células Tet+, el trazador se observó como múltiples puntos distribuidos en el citoplasma, entre núcleo y kinetoplasto, mientras que, en las células Tet-, el marcador se visualizó como un único punto.

*Finalmente, a 28 °C en las células Tet-, el trazador fue detectado como un punto brillante cercano al núcleo mientras que, en las células Tet+, se observó el mismo patrón de puntos que a 12°C.

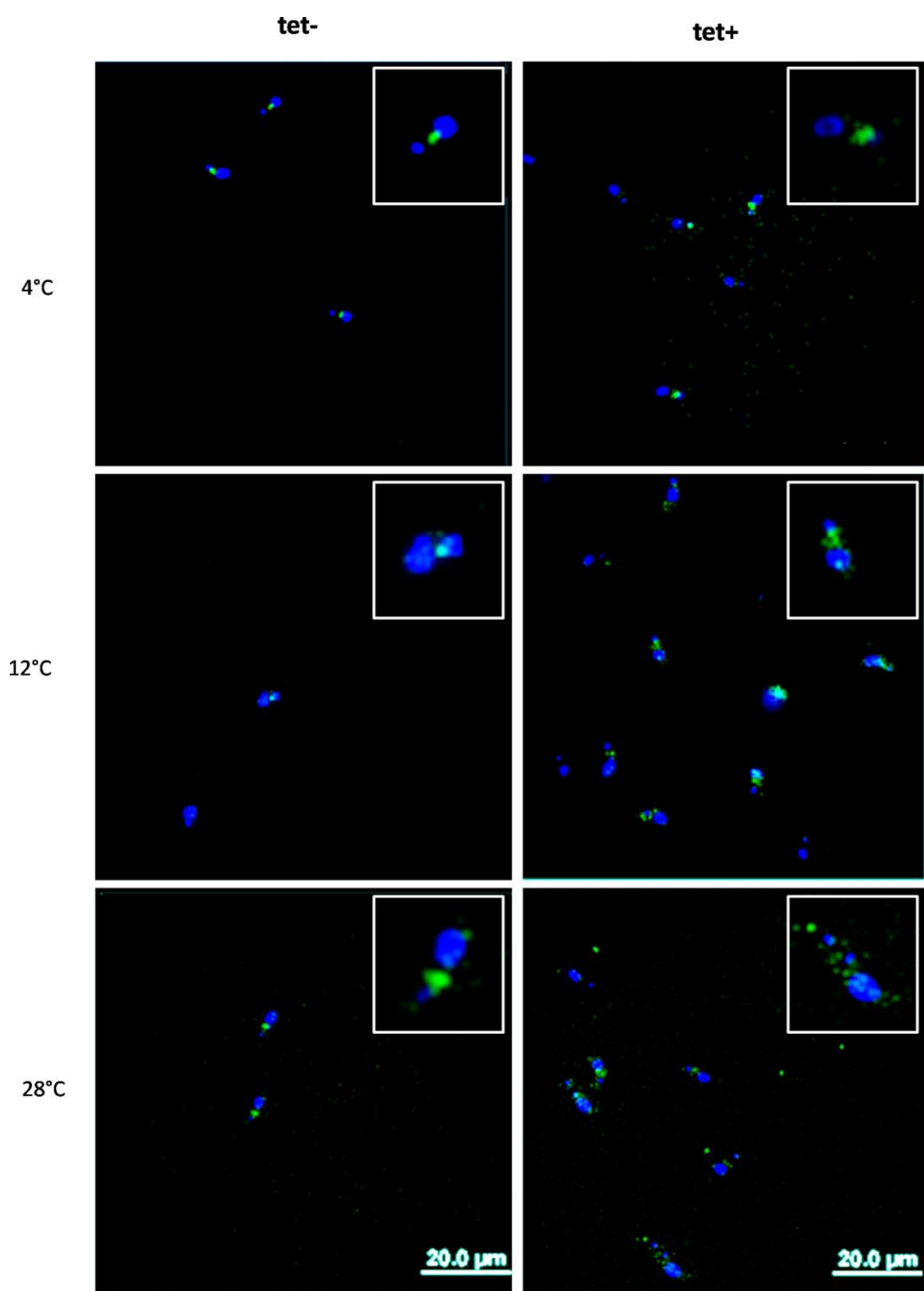
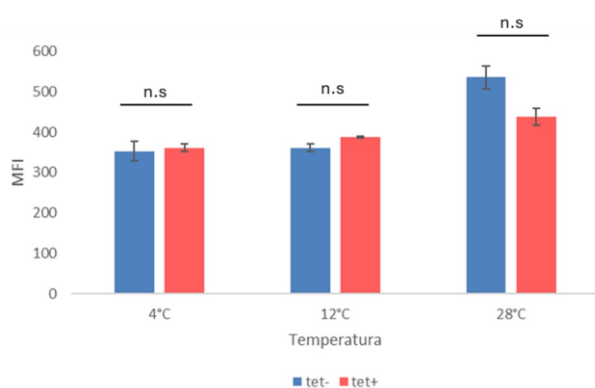


FIGURA 8. Ensayo de FITC- transferrina de la línea celular TbVps32RNAi PCF. Los cultivos de 72 horas de RNAiTbVps32 tratados (Tet+) o sin tratar (Tet-) con Tetraciclina fueron incubados con FITC-transferrina. Las muestras del ensayo fueron teñidas con DAPI (azul) y la captación de FITC-Transferrina (verde) fue examinada mediante microscopia de fluorescencia.

En la **FIGURA 8** se observa que la internalización del trazador ocurre en ambos cultivos celulares a 4°C. A los 12°C en los cultivos Tet+ es interesante observar la marca distribuida y no puntualizada como a 4°C. Ya a los 28°C, el comportamiento del trazador distribuido por todo el citoplasma de las células de los cultivos Tet+, es indicativo de alguna alteración del transporte hacia el lisosoma. De manera preliminar, la marcación con FITC-Transferrina podría sugerir que el silenciamiento de TbVps32 altera el transporte endocítico hacia el lisosoma. En este punto, es importante mencionar que el trazador FITC es sensible al pH, de manera que la fluorescencia se extingue a medida que entra en compartimentos endosomales progresivamente más ácidos. Es decir, disminuye en medios ácidos y aumenta en medios neutros o ligeramente básicos. En estas imágenes no logramos determinar si hay una disminución de la intensidad de fluorescencia, sin embargo, el patrón disperso del trazador indica que la carga no llega al lisosoma, lo cual indicaría el retraso del transporte.

No se obtuvieron resultados comparables con el marcador Alexa 546- Dextrano, ya que no fue posible obtener una marcación significativamente observable por microscopia de fluorescencia. De manera que, aunque los resultados obtenidos con la marcación con FITC-Transferrina podrían corresponderse con los efectos del silenciamiento de TbVps32, la alteración del transporte hacia el lisosoma no pudo reproducirse ni evaluarse con el trazador Alexa 546- Dextrano. Es por ello por lo que, de manera alternativa, la acumulación de la marcación con Alexa 546-Dextrano en la célula fue analizada y cuantificada mediante citometría de flujo (**FIGURA 9**).



(n=2; n.s no significativo; *test de Student*).

FIGURA 9. Ensayo de Dextrano Alexa 546 de la línea celular TbVps32RNAi PCF. Los cultivos RNAiTbVps32 de 72 h tratados con Tetraciclina (Tet+) y sin tratar (Tet-) fueron incubados con el trazador Dextrano Alexa Flúor 546. Posteriormente, se llevó a cabo la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia del trazador de dos experimentos independientes mediante citometría de flujo. MFI (*Mean of Fluorescence Intensity*) medido en unidades arbitrarias.

Tal como se puede observar, la cuantificación de Dextrano Alexa 546 arrojó un resultado con tendencia diferencial a 28°C entre los cultivos Tet+ y Tet- (**FIGURA 9**). Sin embargo, no se registraron diferencias cuantitativas a 4°C y 12 °C. Es decir, según este resultado, la carga (trazador) podría estar siendo internalizada por las células Tet+ con la misma eficiencia a la que lo hace la célula del cultivo control (Tet-, resultado a 4°C). A 12 °C, la carga sería transportada por vesículas hacia el lisosoma. De acuerdo con este resultado, la cuantificación de la señal muestra que la intensidad de fluorescencia tiende a ser similar en ambos cultivos. Podría pensarse que el transporte en las vesículas, en este punto, se lleva a cabo de similar manera en ambos cultivos. Mientras tanto, a 28 °C se observa una tendencia a la disminución de la concentración de Alexa 546-Dextrano en las células Tet+ en comparación con las células Tet-. De manera que, es posible que toda la carga internalizada que se encontraba viajando hacia el lisosoma, finalmente no haya llegado al mismo.

El resultado obtenido con el trazador Alexa 546-Dextrano podría respaldarse con los resultados obtenidos con la marcación de FITC- Transferrina observada por microscopia de fluorescencia ya que, a 28°C, el trazador se encuentra distribuido en el citoplasma como ocurre a los 12°C (**FIGURA 8**). Es decir, es posible que toda la carga no pueda alcanzar el lisosoma o que sea posible un retraso del transporte hacia este compartimento subcelular. En definitiva, estos resultados sugieren que el silenciamiento de TbVps32 no afecta la internalización del trazador, pero sí podría afectar el transporte hacia el lisosoma. No obstante, el interrogante es si el silenciamiento de TbVps32 produce el retraso del transporte hacia el lisosoma a través del sistema endocítico o si afecta algún componente de la ruta que consecuentemente afecta el transporte de toda la carga/trazador.

2.2 Estudio funcional de TbVps32 PCF mediante sobreexpresión inducida.

Con toda la evidencia hasta aquí hallada, abordamos la estrategia de sobreexpresión inducida de la proteína TbVps32 con una etiqueta HA en su N-terminal, siendo nuestro objetivo no sólo determinar la localización de TbVps32 sino comprender en profundidad los mecanismos en los cuales estaría participando en *T. brucei* PCF. El fragmento obtenido mediante PCR fue

subclonado en el vector pGEM-T y luego clonado en el vector pLew100v5-BSD, el cual permite una regulación positiva inducible por Tetraciclina. Luego, el constructo resultante fue linealizado con NotI y parásitos de la cepa 29-13 en estadio procíclico (PCF) fueron transfectados. Posteriormente, las células fueron seleccionadas con blasticidina durante cuatro semanas, momento para el cual se obtuvieron líneas celulares estables.

Con el objetivo inicial de confirmar la expresión de HA-TbVps32 y evaluar la capacidad proliferativa de los cultivos, se procedió a la construcción de curvas de crecimiento. De esta manera, cultivos Tet+ y Tet- fueron contabilizados mediante cámara de Neubauer día por día, durante una semana. Simultáneamente, fueron colectadas muestras a las 24 horas y a las 48 horas de los cultivos Tet- y Tet+. La expresión exitosa de TbVps32 en *T. brucei* PCF se observó a las 24 horas y 48 horas después del tratamiento con Tetraciclina mediante microscopía de fluorescencia y WB.

La proteína HA-TbVps32 se detectó como una banda entre 35 y 45 kDa; sin embargo, considerando que el tag HA tiene un peso de 1102.17 Da, el peso molecular estimado de TbVps32 sería de aproximadamente 34 kDa. (**FIGURA 10**). Este peso molecular es concordante con el registrado en *T. cruzi* el cual rondaba entre los 32 kDa y los 46 kDa. En este punto, es significativo recordar que el PM teórico de TbVps32 es de 26 kDa (Shen et al., 2014).

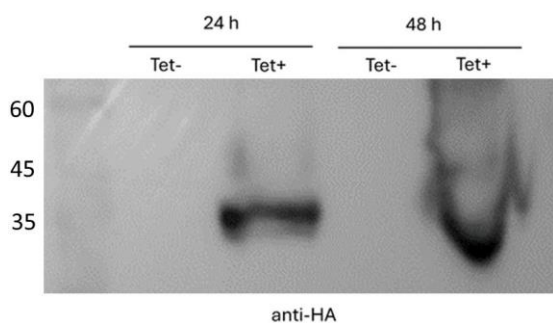


FIGURA 10. Expresión de HA-TbVps32pLew100v5 PCF. El nivel de expresión de HA-TbVps32 fue evaluado mediante WB, tomando muestras de los cultivos a las 24 horas y 48 horas. Los sobrenadantes de los extractos de proteína total (40µg de masa de proteínas) fueron resueltos en SDS-PAGE 12% y transferidos a membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el anticuerpo primario anti-HA y luego con anticuerpo secundario anti- IgG de rata conjugado a HRP. La banda correspondiente a HA-Vps32 se ubica entre los 35 kDa y 45 kDa.

A través de ensayos de inmunofluorescencia y la visualización mediante microscopía de fluorescencia, evidenciamos la localización citoplasmática de HA-TbVps32 como se muestra

en la **FIGURA 11**, disponiéndose principalmente en forma de gránulos entre el núcleo y el kinetoplasto. Nuevamente, esta localización citoplasmática fue coincidente con la reportada por la base de datos de proteínas TrypTag y compatible con la localización registrada de TcVps32 de *T. cruzi*. Asimismo, la localización citoplasmática de TbVps32 se corresponde con la reportada para otras proteínas miembros de ESCRT, es decir, en la parte posterior de la célula entre núcleo y kinetoplasto, típica ubicación del sistema endocítico en tripanosomátidos.

La evaluación de la capacidad proliferativa de la línea celular HA-TbVps32 mediante curvas de crecimiento utilizando cultivos Tet⁻ como control, mostraron que el crecimiento celular comienza a disminuir a las 48 horas, siendo sumamente significativo a las 72 horas. A ese tiempo, los parásitos de los cultivos Tet⁺ no recuperan su capacidad proliferativa luego de diluirlos en medio fresco, mientras que los cultivos Tet⁻ proliferan normalmente y alcanzan valores de densidad máxima al cabo de los 7 días (**FIGURA 12**). Estos resultados podrían indicar que la sobreexpresión de TbVps32 afecta el crecimiento y viabilidad de los parásitos, y, por lo tanto, podrían sugerir que TbVps32 es esencial para la supervivencia de los parásitos.

De acuerdo con las curvas de crecimiento y al resultado de WB, todos los experimentos subsiguientes fueron llevados a cabo a las 48 horas de inducción con Tetraciclina, ya que a este tiempo se detecta una expresión de HA-TbVps32 considerable y se observa la contundente disminución de la densidad celular sin afectar la supervivencia de los parásitos.

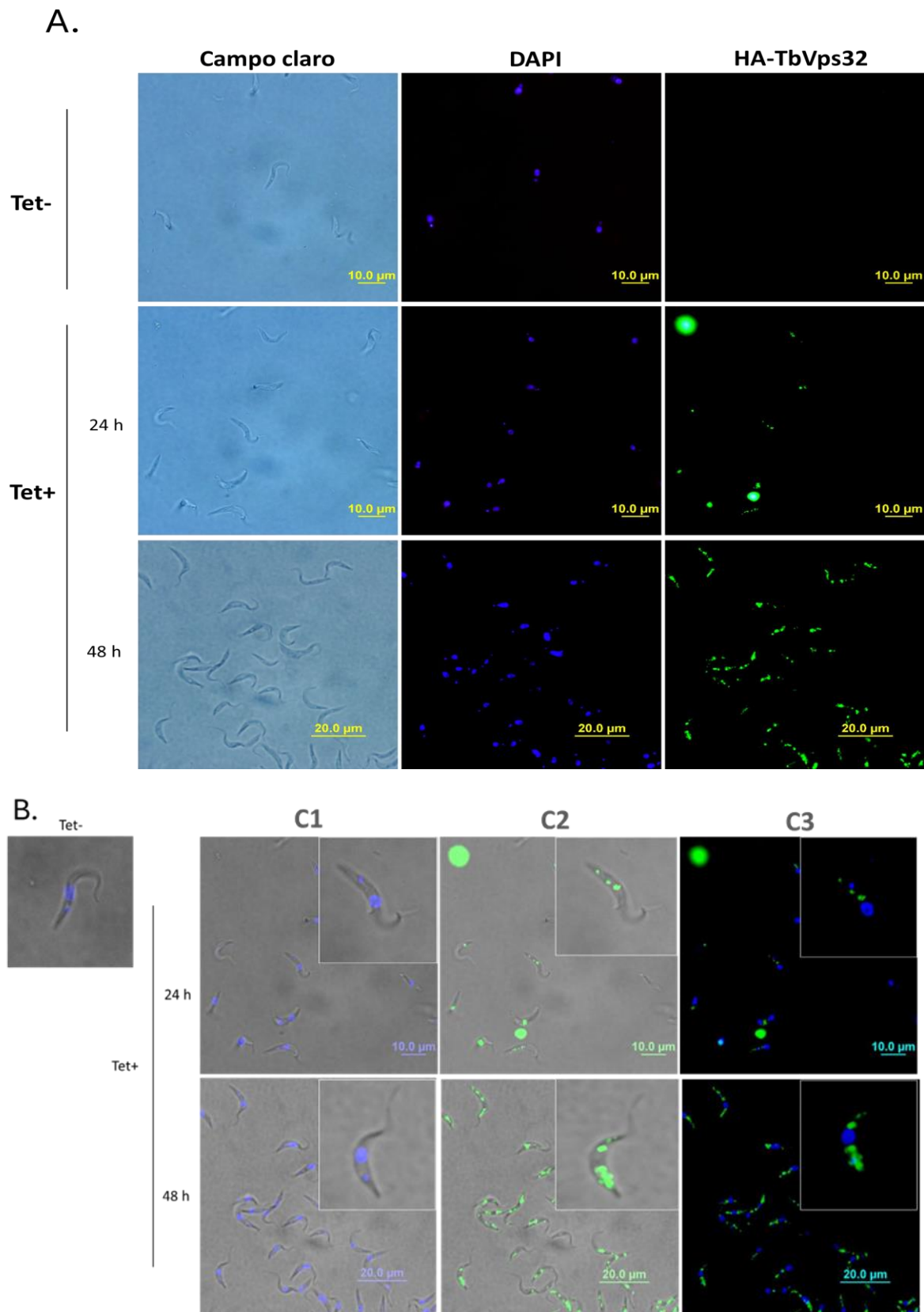


FIGURA 11. Sobreexpresión de HA-TbVps32 de *T. brucei* PCF. A. Se tomaron muestras de los cultivos de 24 horas sin tratar con Tetraciclina (Tet-) y, también tratados a las 24 horas y 48 horas (Tet+). **B.** La

marca de HA-TbVps32 fue detectada en el citoplasma a través de la marcación con el anticuerpo anti-HA (verde) y curiosamente se observa mayor fluorescencia en los cultivos Tet+ a 48 horas respecto al de 24 horas. Las muestras además fueron teñidas con DAPI (azul) para la tinción de núcleo y kinetoplasto y la marca HA-TbVps32 se dispuso entre ambas estructuras subcelulares.

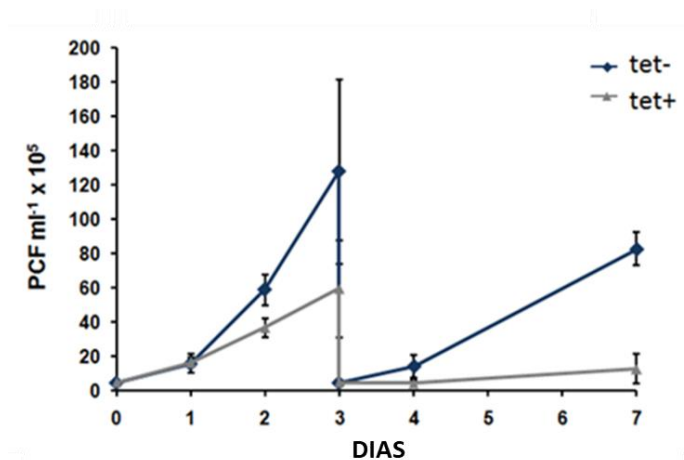


FIGURA 12. HA-TbVps32 es esencial para el crecimiento de *T. brucei* estadio procíclico (PCF). Fueron construidas curvas de crecimiento para evaluar la capacidad proliferativa de los cultivos HA-TbVps32pLew100v5-BSD tratados con Tetraciclina (Tet+) y sin tratar (Tet-). El crecimiento se controló diariamente mediante recuento celular con cámara de Neubauer. Los datos son medias $\pm$ SEM (n =3).

2.2.1 Sobreexpresión de HA-TbVps32 y transporte vesicular

Ya teniendo conocimiento sobre los efectos de la sobreexpresión de HA-TbVps32 sobre la proliferación, la supervivencia de los parásitos y de acuerdo con la localización citoplásmica observada, nuestro primer objetivo se centró en determinar la localización subcelular de HA-TbVps32 de manera de establecer un vínculo directo con su participación en el transporte intracelular. Debido a la distribución observada de HA-TbVps32 en el citoplasma y teniendo en cuenta los resultados del silenciamiento de TbVps32 sobre el transporte hacia el lisosoma, procedimos a evaluar la posibilidad de la co-localización de la señal HA-Vps32 con un marcador para endosomas. Al no contar en el laboratorio con anticuerpos tales como Rab5A y Rab5B, específicos para endosomas, se utilizó el trazador Alexa 546-Dextrano ya que, según las especificaciones del fabricante, funciona como marcador de endosomas tempranos a 12°C

(Allen et al., 2003). De esta manera, las células Tet+ de 48 horas se incubaron con Dextrano a la temperatura indicada y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la **FIGURA 13**, la marca de la proteína HA-TbVps32 co-localiza con la marcación del Dextrano y la señal se detectó entre el núcleo y el kinetoplasto. De esta manera, HA-TbVps32 parecería encontrarse asociada a endosomas y por lo tanto, se encontraría relacionada con el transporte endocítico tal como ha sido reportado en otros organismos e incluso, según nuestros resultados previos.

Asimismo, decidimos realizar la marcación de endosomas tempranos con el anticuerpo EEA-1 utilizado usualmente en *T. cruzi*, en nuestro laboratorio. El objetivo de su uso fue reproducir lo detectado con el uso del Alexa 546- Dextrano, es decir, determinar realmente si la proteína se encontraba asociada a endosomas y, asimismo, determinar si específicamente se encontraba en endosomas tempranos. Según nuestros resultados, se evidenció la co-localización parcial de las marcas anti-HA y anti- EEA-1 (**FIGURA 14**). Es decir, es posible que la ubicación de TbVps32 no se restrinja únicamente a endosomas tempranos, sino que forme parte de otras estructuras endocíticas, como endosomas tardíos y de reciclaje, por ejemplo.

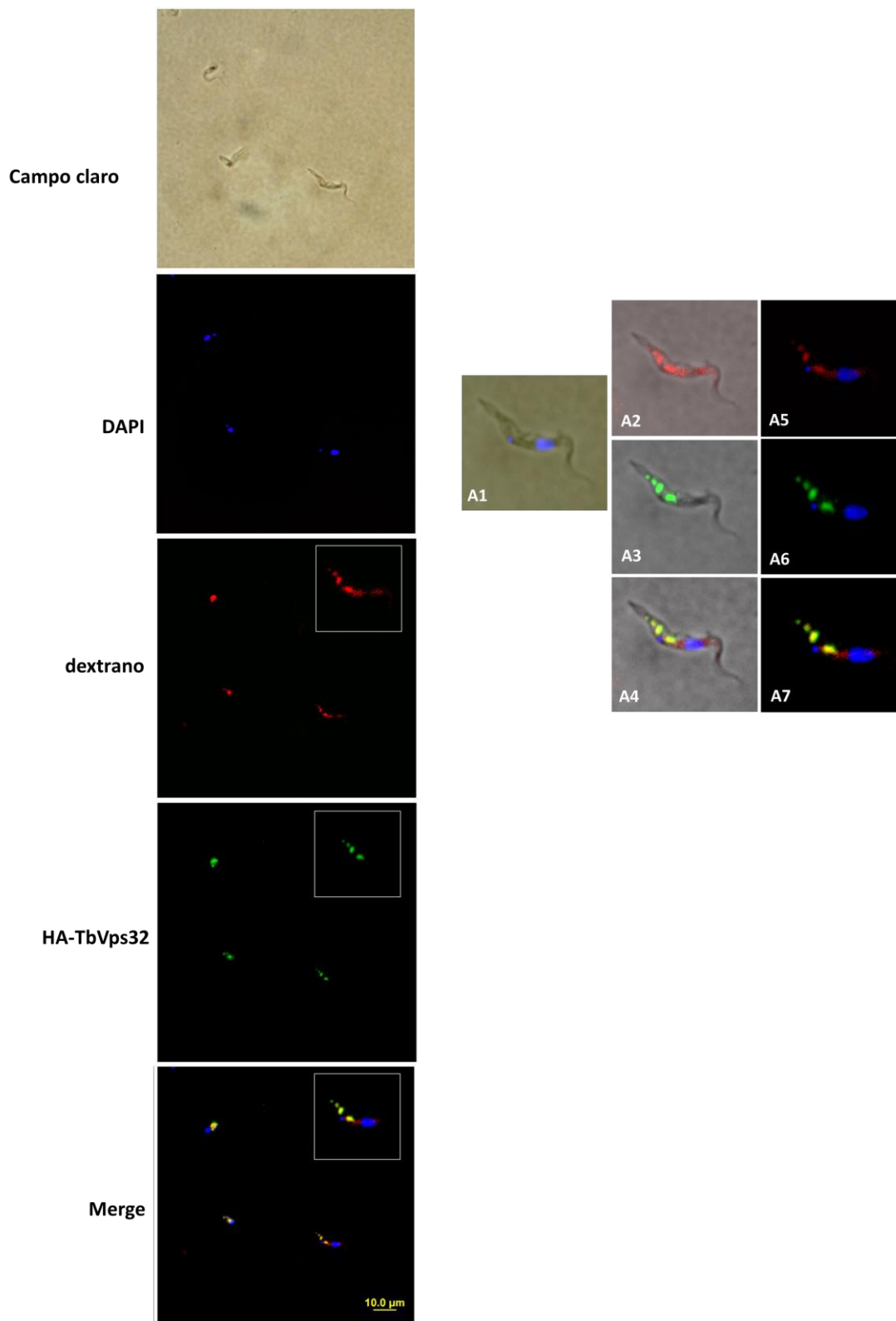


FIGURA 13. Localización subcelular de HA-TbVps32. Las líneas celulares HA-TbVps32pLew100v5-BSD

fueron tratadas con Tetraciclina (Tet+) durante 48 horas y se incubaron con Dextrano Alexa-546 a 12°C para identificar compartimentos endocíticos. Se tomaron muestras y se incubaron con anti-HA (verde) y se tiñeron con DAPI (azul). La fluorescencia se examinó mediante microscopía de fluorescencia. Se puede observar la superposición (Merge) de las señales de HA-TbVps32 (verde) y del trazador Alexa 546-Dextrano (rojo) en el citoplasma del parásito. Las marcaciones se observan con mayor detalle en las imágenes de la derecha. **A1:** Merge campo claro y DAPI. **A2:** Merge campo claro y dextrano Alexa 546. **A3:** Merge campo claro y HA-TbVps32. **A4:** Merge de A1, A2 y A3. **A5:** Merge Dextrano Alexa 546 y DAPI, **A6:** Merge HA-TbVps32 y DAPI y **A7:** Merge A5 y A6.

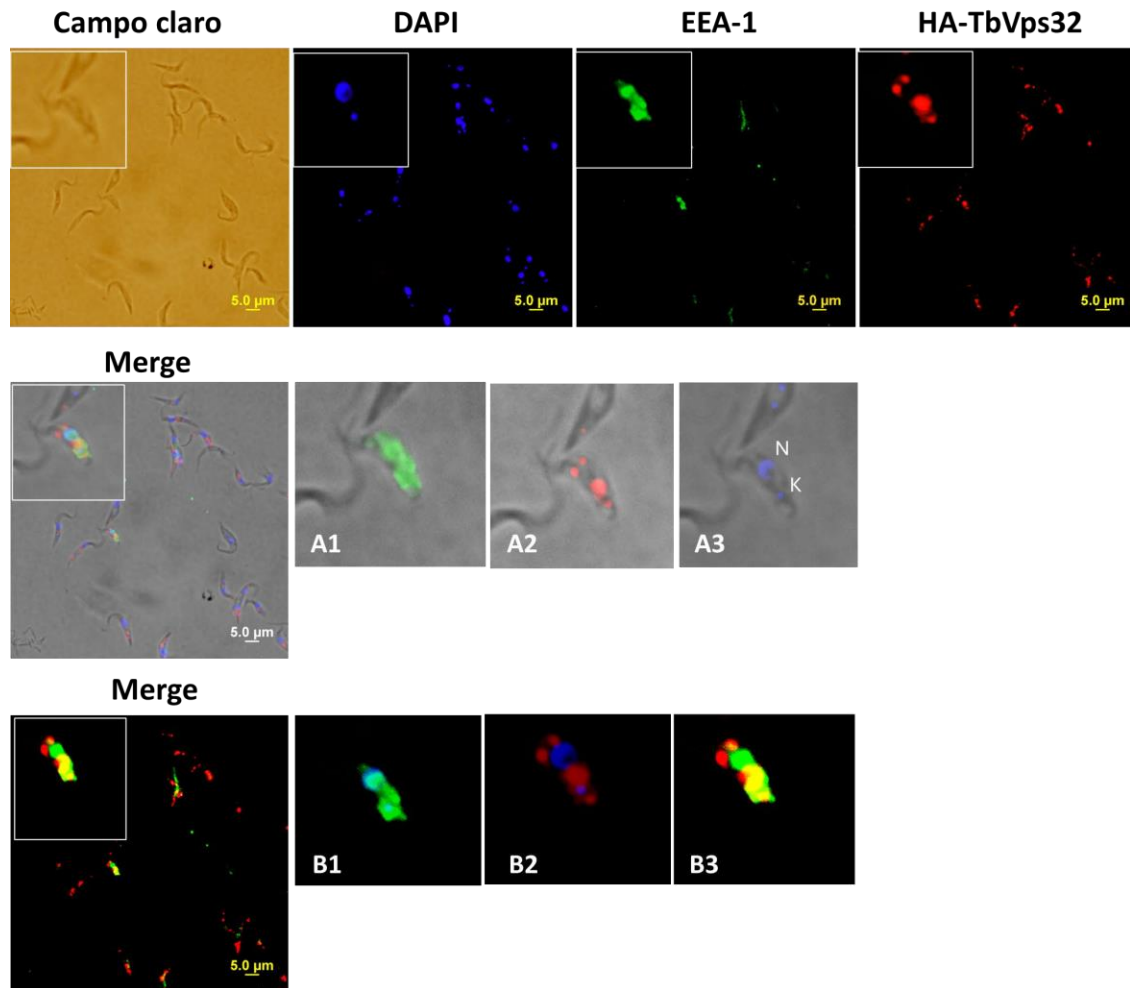
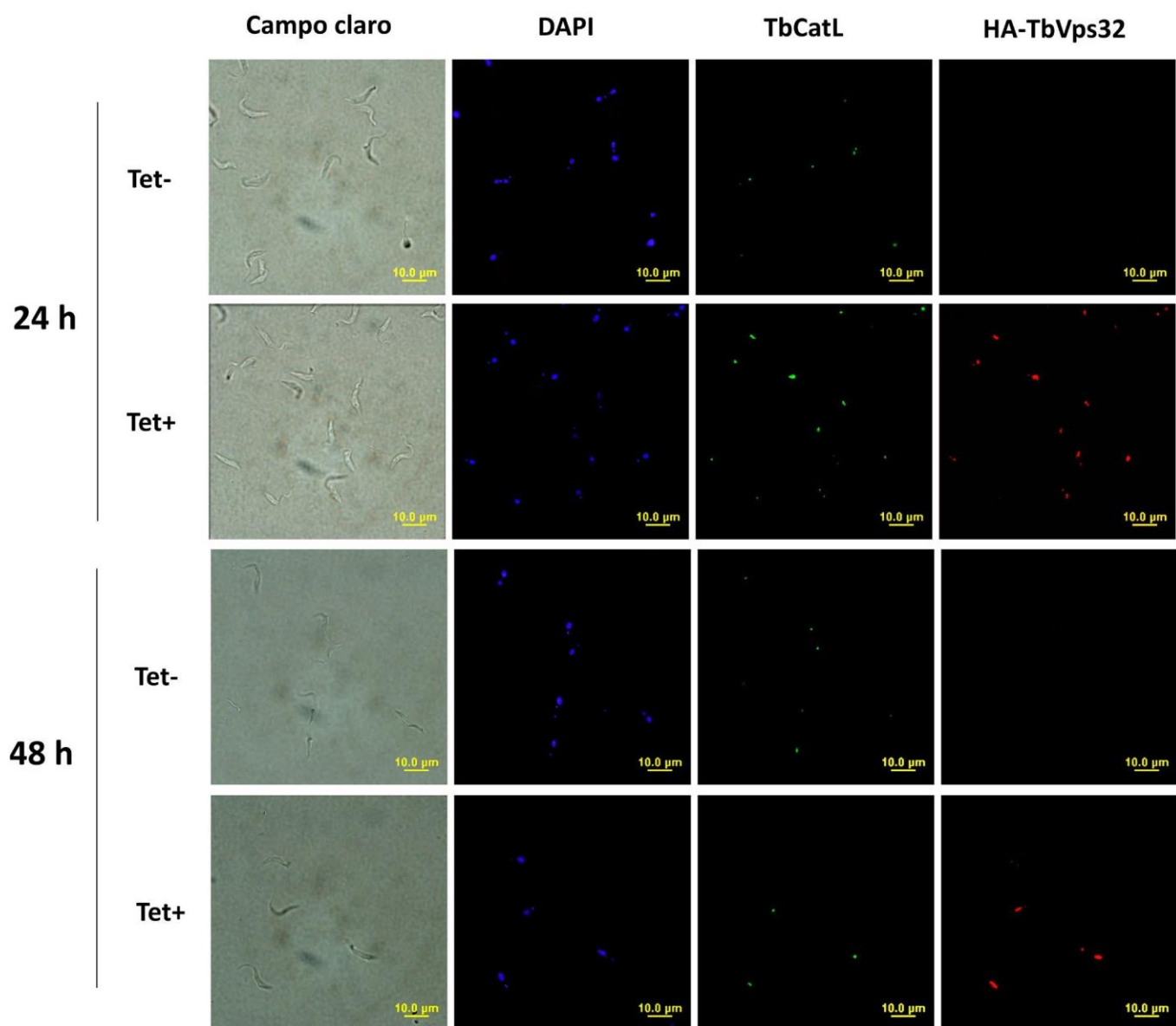


FIGURA 14. Localización subcelular de HA-TbVps32. Las líneas celulares HA-TbVps32pLew100v5-BSD fueron tratadas con Tetraciclina (Tet+) durante 48 horas y las muestras se incubaron con los anticuerpos anti-EEA1(verde), anticuerpo específico para endosomas tempranos, y anti-HA (rojo) para HA-TbVps32. Asimismo, los núcleos y kinetoplastos fueron teñidos con DAPI (azul). La fluorescencia se examinó mediante microscopía de fluorescencia. Se puede observar la co-localización de las señales de HA-TbVps32 y EEA1. **Merges:** **A1:** Merge campo claro y EEA1. **A2:** Merge campo claro y HA-TbVps32. **A3:** Merge campo claro y DAPI. **B1:** Merge de DAPI y EEA1. **B2:** Merge DAPI y HA-TbVps32, **B3:** Merge B1 y B2.

Ya contando con todos estos resultados, nuestro objetivo se centró en determinar si TbVps32 se encontraría implicada en el transporte endocítico hacia el lisosoma y para ello, los cultivos Tet+ a las 48 horas fueron incubados con el anticuerpo anti-TbCatL, marcador específico de lisosomas. Sorprendentemente, las células inducidas mostraron una mayor intensidad fluorescente de la marcación de anti-TbCatL tanto a las 24 horas como a las 48 horas, en comparación con la marcación observada de las células no inducidas a los mismos tiempos (**FIGURA 15**). Asimismo, pudo apreciarse la co-localización parcial de las marcas de HA-TbVps32 y TbCatL.

El DQ-red BSA es una carga (trazador) que consiste en BSA (albúmina sérica bovina) fuertemente marcada con un colorante fluorescente rojo brillante. Este trazador es internalizado en las células por los mecanismos de transporte celulares. De esta manera, con el objetivo de evaluar la ruta endocítica hacia el lisosoma, se llevó a cabo el ensayo funcional de DQ-red BSA (*Dye Quenched-Bovine Serum Albumin*) que es aplicable a varios tipos celulares y que es de utilidad para la evaluación de la viabilidad celular, la proliferación y para ensayos funcionales de proteínas (Marwaha & Sharma, 2017). De manera general, las células intercambian constantemente materiales con su entorno extracelular y en este proceso internalizan la carga en vesículas desde la membrana plasmática. Durante el tránsito desde los endosomas tempranos (EE) hacia los lisosomas, la carga destinada a ser degradada se desplaza desde endosomas tempranos hacia los endosomas tardíos (LE) y finalmente se fusiona con el lisosoma, lugar donde el pH oscila entre 4,5 y 5,0. Mediante este mismo mecanismo, luego de producirse la internalización del DQ-red BSA por el bolsillo flagelar desde el medio extracelular, el trazador que actúa como carga es transportado a través de endosomas. Cuando se produce la fusión de los endosomas con el lisosoma, dando como resultado una estructura denominada endolisosoma, el DQ-red BSA se descompone en fragmentos más pequeños por el efecto de las hidrolasas, las cuales requieren un ambiente ácido para la degradación de la carga (Garg et al., 2011; Khatter, Raina, et al., 2015; Khatter, Sindhvani, et al., 2015).

A.



B.

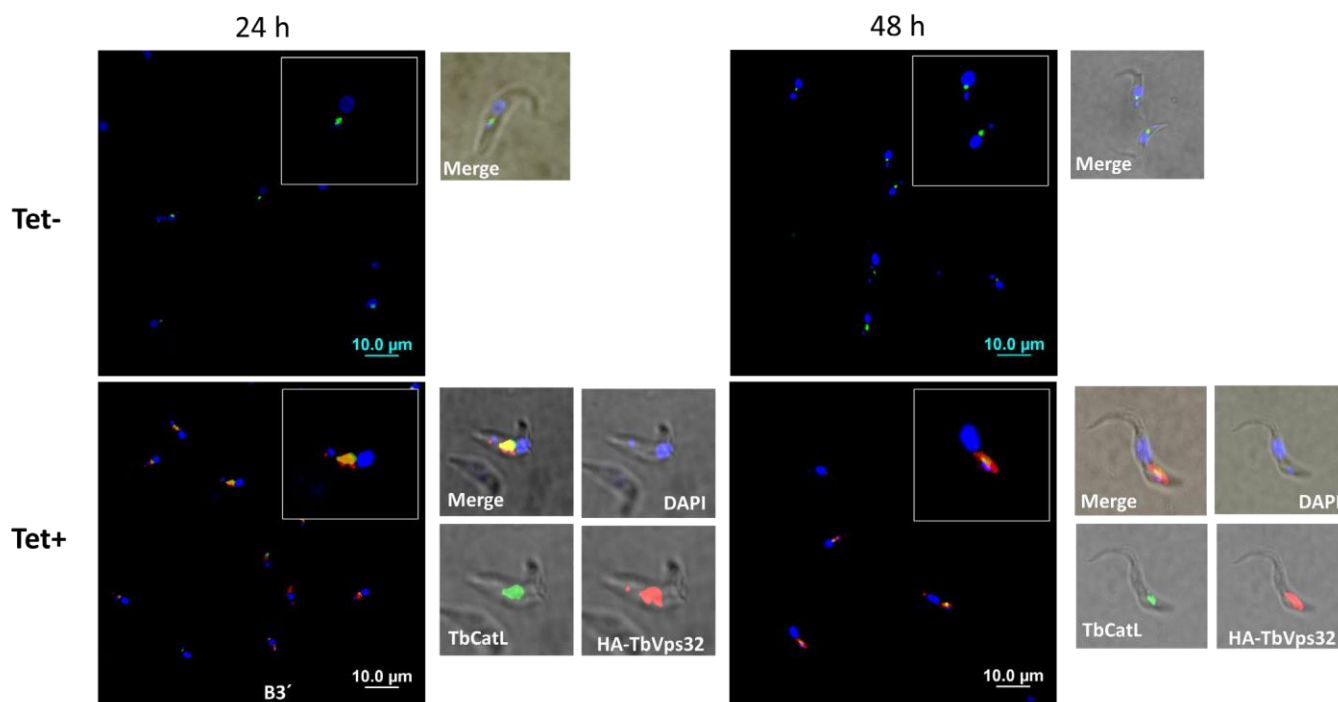


FIGURA 15. Participación de HA-TbVps32 en el transporte vesicular. **A.** Se tomaron muestras a las 24 horas y 48 horas de los cultivos HA-TbVps32pLewv100 tratados (Tet+) y sin tratar con Tetraciclina (Tet-). Posteriormente las muestras fueron teñidas con DAPI (azul) e incubadas con anti-HA para la marcación de HA-TbVps32 (rojo) y anti-TbCatL para la visualización de los lisosomas (verde). La fluorescencia se examinó mediante microscopía de fluorescencia. Los cultivos Tet+ tanto a las 24 horas como a las 48 horas mostraron mayor intensidad de fluorescencia de anti-TbCatL(verde) respecto a las células Tet-. **B.** Merges: se observa la co-localización de las señales de HA-Vps32 y TbCatL.

La degradación de DQ-red BSA en estos compartimentos ácidos da como resultado fragmentos de proteínas más pequeños unidos a fluoróforos aislados, lo que se puede visualizar como una fluorescencia brillante en las células debido al proceso de “*de-quenching*”. Es destacable que la fluorescencia observada sería prácticamente nula o indetectable en el caso que el transporte hacia el lisosoma esté afectado y, en consecuencia, no pueda producirse la proteólisis de DQ-red BSA. Es por este mecanismo que se reconoce a este trazador como un marcador de estructuras subcelulares ácidas.

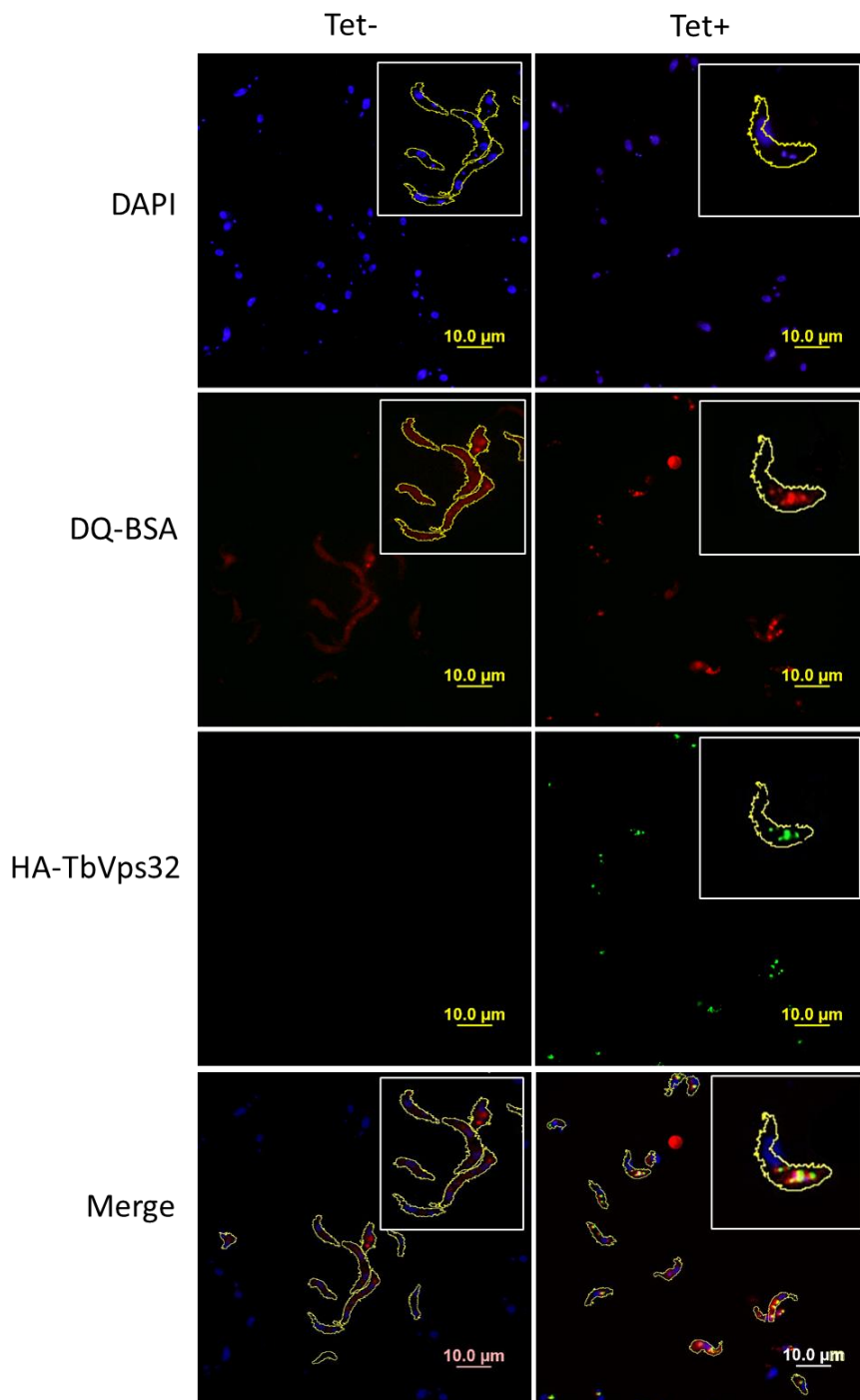
El ensayo funcional se desarrolló incubando las células Tet- y Tet+ (48 horas) con DQ-red BSA a 28°C durante 30 min. El resultado se muestra en la **FIGURA 16A** en la cual se puede apreciar

la co-localización de la marca de HA-Vps32 con la marca de DQ-red BSA. La intensidad de fluorescencia fue mayor en las células Tet⁺ respecto a las células Tet⁻. Adicionalmente, las imágenes obtenidas fueron además analizadas cuantitativamente utilizando el programa de procesamiento digital *ImageJ* (**FIGURA 16B**). Para ello, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de un total de 100 parásitos de cultivos Tet⁺ y 100 parásitos de cultivos Tet⁻, lo cual demostró que la intensidad de fluorescencia de DQ- red BSA fue significativamente mayor en células inducidas que en las células control.

Con el objetivo de confirmar la presencia del lisosoma entre los compartimentos degradativos marcados con DQ-red BSA, nuevamente se procedió a realizar el ensayo, pero, en este caso, las muestras obtenidas fueron incubadas con el anticuerpo anti-TbCatL para la marcación de lisosomas. A través de las imágenes obtenidas, se pudo observar la co-localización existente de las señales de DQ- red BSA y TbCatL (**FIGURA 17**).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que TbVps32 de *T. brucei* PCF se encuentra asociado a endosomas (endosomas tempranos, endosomas tardíos y endolisosomas) y participa en el transporte de proteínas desde endosomas hacia el lisosoma. La mayor intensidad de fluorescencia de DQ-red BSA en cultivos que sobreexpresan la proteína respecto aquellos que no lo hacen, podría indicar que la sobreexpresión de TbVps32 provoca el aumento del transporte de proteínas hacia el lisosoma por aumento de la dotación de compartimentos y el incremento de la capacidad de internalización de la carga.

A.



B.

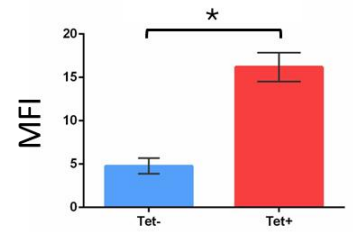


FIGURA 16. Participación de HA-TbVps32 en el transporte vesicular. Las líneas celulares HA-TbVps32 tratadas con Tetraciclina (Tet+) y no tratadas (Tet-) durante 48 horas fueron sometidas al ensayo de DQ-red BSA (rojo) durante 30 min. **A.** Las muestras obtenidas del ensayo fueron posteriormente incubadas con el anticuerpo anti-HA (rata) para marcar la presencia de HA-TbVps32 y con DAPI (azul) para la tinción de núcleos y kinetoplastos. La fluorescencia se examinó mediante microscopía de fluorescencia evidenciándose la superposición de las señales de HA-TbVps32 y DQ-

red BSA. **B.** La cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de DQ-red BSA (MFI) fue llevada a cabo mediante *ImageJ* (n=3, 30 células fueron contabilizadas por experimento). Se observa significativa diferencia de intensidad de fluorescencia de DQ-red BSA de los cultivos Tet⁺ respecto al cultivo control (Tet⁻). MFI se encuentra expresada en unidades arbitrarias. Los datos se encuentran expresados como la media $\pm$ SEM. (*; p<0,0001 *test de Student*).

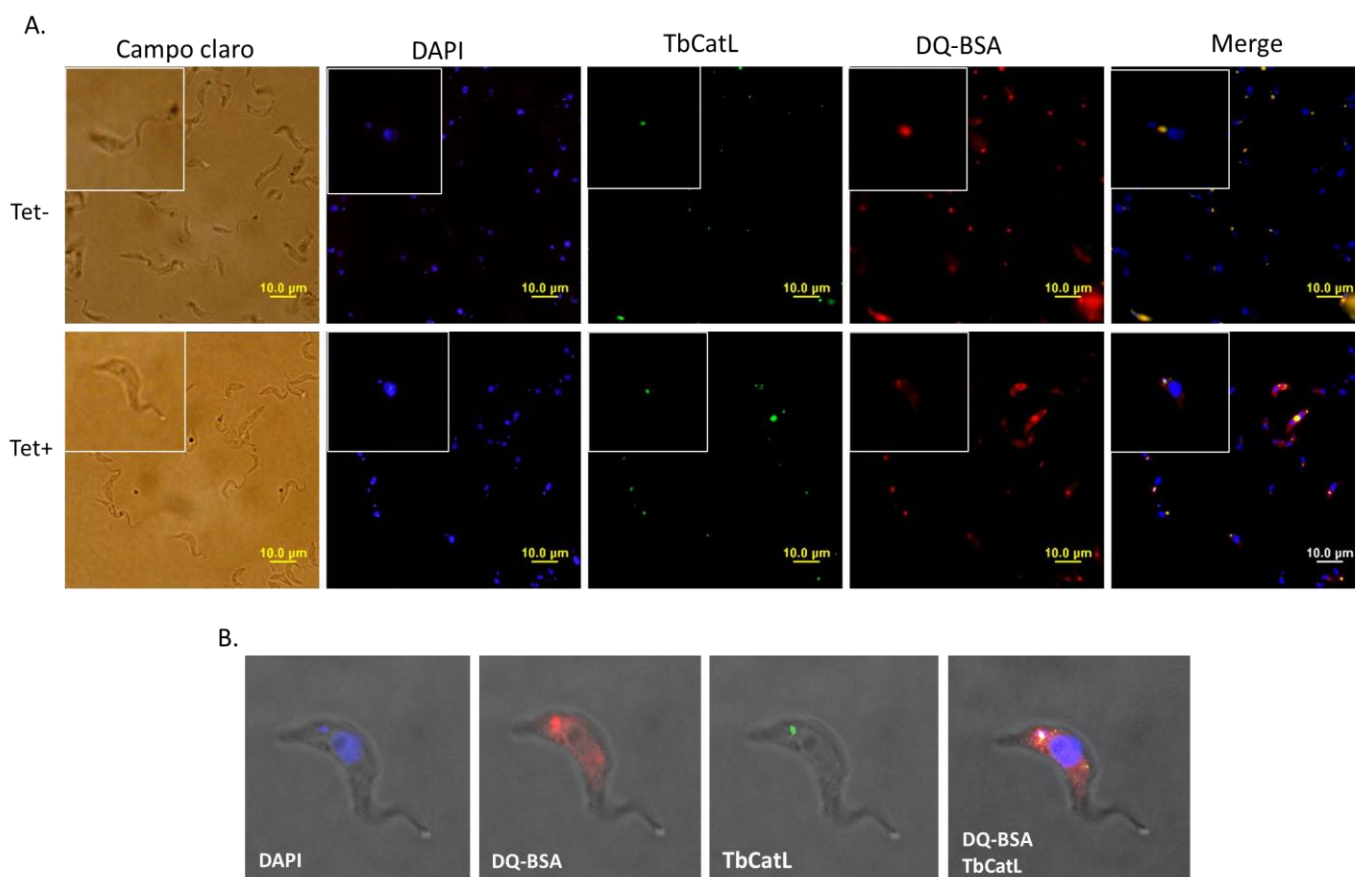


FIGURA 17. Participación de HA-TbVps32 en el transporte vesicular. A. Los cultivos tratados (Tet+) y sin tratar con Tetraciclina (Tet-) durante 48 horas fueron sometidos al ensayo con el trazador DQ-red BSA (rojo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-TbCatL (verde), marcador de lisosomas, de manera de dilucidar el rol de TbVps32 en el transporte endocítico hacia los lisosomas. Se evidencia la co-localización de las señales correspondientes a DQ-red BSA y HA-TbVps32 (Merge y paneles B). **B.** Imagen ampliada de los Merges con el campo claro: co-localización de las señales DQ-red BSA (rojo) y anti-TbCatL (verde).

3. Vps32 de *Trypanosoma brucei* estadio sanguíneo (*bloodstream form* o BSF)

El estudio de Vps32 en *T. brucei* estadio sanguíneo o *bloodstream* (BSF) posee una importancia destacada ya que constituye el agente infeccioso en humanos y animales. El estudio de Vps32 en estos parásitos durante el estadio sanguíneo nos resulta de total interés ya que los mismos utilizan los mecanismos de transporte intracelulares para el

mantenimiento de sus funciones metabólicas y para producir el intercambio de las proteínas de la superficie celular como lo son las proteínas VSG (*Variant surface glycoprotein*), mecanismo por el cual estos parásitos evaden la respuesta inmune generada por el huésped.

Teniendo evidencia de la localización TbVps32 y su rol en el transporte endocítico de *T. brucei* PCF, fue de nuestro interés indagar si esta proteína se encuentra involucrada en los mecanismos de transporte durante el estadio infectivo del parásito. De esta manera, la misma construcción HA-TbVps32 utilizada en el estadio PCF, con sitios de restricción NheI y BamHI en el vector pLew100v5-BSD, fue linealizada con NotI e incorporada por electroporación en parásitos sanguíneos cepa SM (*Single Marker*). Luego de la transfección, la selección fue llevada a cabo con la incorporación de blasticidina al medio HMI-9.

Tal como se había realizado para las líneas celulares HA-TbVps32pLew100v5-BSD PCF, se procedió a evaluar el comportamiento de los cultivos mediante curvas de crecimiento (**FIGURA 18**). Las mismas demostraron que los cultivos HA-TbVps32pLew100v5 tratados con Tetraciclina (Tet+) y los cultivos control (Tet-) presentaron una densidad celular similar luego del primer día de tratamiento; sin embargo, al día 2 se observó una considerable disminución de la densidad celular de los cultivos Tet+. En el segundo día, luego de la dilución de los cultivos a la concentración inicial establecida para la curva de crecimiento, se observó que la densidad celular se mantuvo en niveles comparables a los registrados al inicio del experimento. Es decir, la capacidad proliferativa de los cultivos HA-TbVps32pLew100v5-BSD se ve afectada cuando se induce la sobreexpresión de HA-TbVps32 BSF.

De acuerdo con el comportamiento observado en las curvas de crecimiento, se tomaron muestras a las 24 horas para evaluar la expresión de HA-TbVps32 BSF mediante WB. De esta manera, se obtuvo una banda de aproximadamente 35 kDa; sin embargo, teniendo en cuenta que el tag HA posee un peso de 1102.17 Da, el peso molecular aproximado de TbVps32 BSF fue de 34 kDa (**FIGURA 19**), peso molecular concordante con el registrado para TcVps32 de *T. cruzi* (el cual rondaba entre los 32 kDa y los 46 kDa), y principalmente,

el mismo peso molecular registrado para TbVps32 PCF.

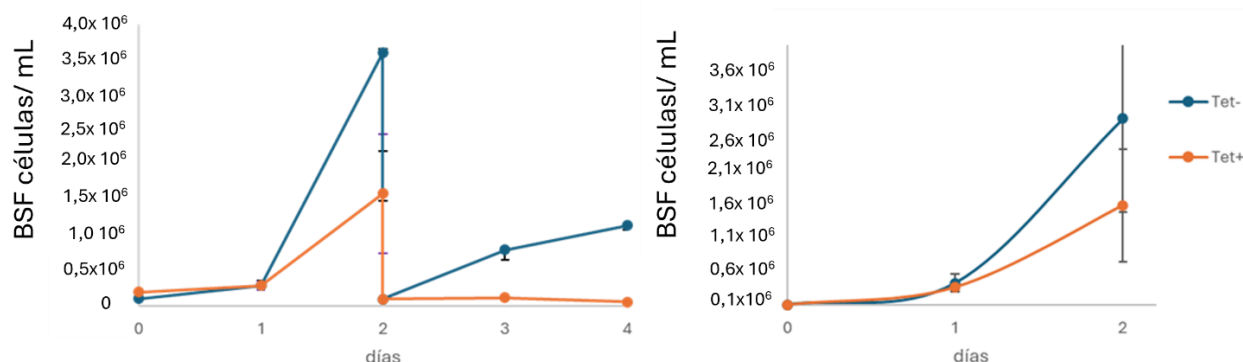


FIGURA 18. Curva de crecimiento de la línea HA-TbVps32pLew100v5 BSF. Las curvas de crecimiento fueron construidas para evaluar la capacidad proliferativa de los cultivos HA-TbVps32pLew100v5-BSD de *T. brucei* BSF, tratados con Tetraciclina (Tet+) y sin tratar (Tet-). Los cultivos no logran recuperarse luego de la dilución llevada a cabo en el día 2, lo cual es evidente por las densidades mínimas registradas durante los días 3 y 4 (izquierda). Curva de crecimiento de los cultivos hasta el día 2 (derecha). Las diferencias de densidad celular se hacen evidentes entre cultivos a partir del día 1. El crecimiento se controló diariamente mediante recuento celular con cámara de Neubauer. Los datos son medias $\pm$ SEM (n=3).

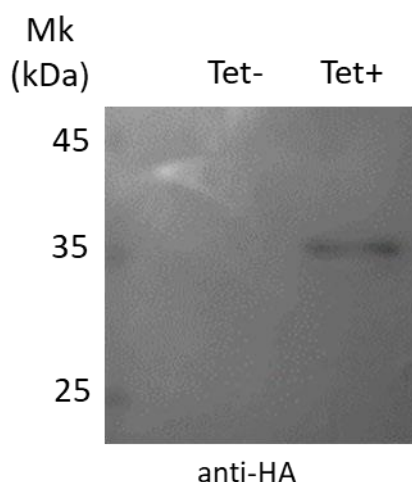


FIGURA 19. Expresión de HA-TbVps32pLew100v5 BSF. El nivel de expresión de HA-TbVps32 fue evaluado mediante WB, tomando muestras de los cultivos a las 24 horas. Los sobrenadantes de los extractos de proteína total (40 μ g de masa de proteínas) fueron resueltos en SDS-PAGE 12% y transferidos a membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el anticuerpo primario anti-HA y luego con anticuerpo secundario anti- IgG de rata conjugado a HRP. La banda correspondiente a HA-TbVps32 se ubica en los 35 kDa aproximadamente.

Paralelamente, se tomaron muestras de ambos cultivos HA-TbVps32pLew100v5-BSD (Tet- y Tet+) de 24 horas de inducción con la droga, con el objetivo de determinar la localización subcelular de TbVps32 (**FIGURA 20**). Ya que los resultados previos indicaban que TbVps32 era partícipe de la ruta endocítica hacia el lisosoma, las muestras fueron incubadas con el

anticuerpo anti-TbCatL, marcador del lisosoma. De esta manera, la proteína HA-TbVps32 BSF se observó dispuesta en el citoplasma celular cercana al núcleo y en asociación aparente con el lisosoma, ya que la señal correspondiente a HA-TbVps32 co-localiza con el anticuerpo anti-TbCatL.

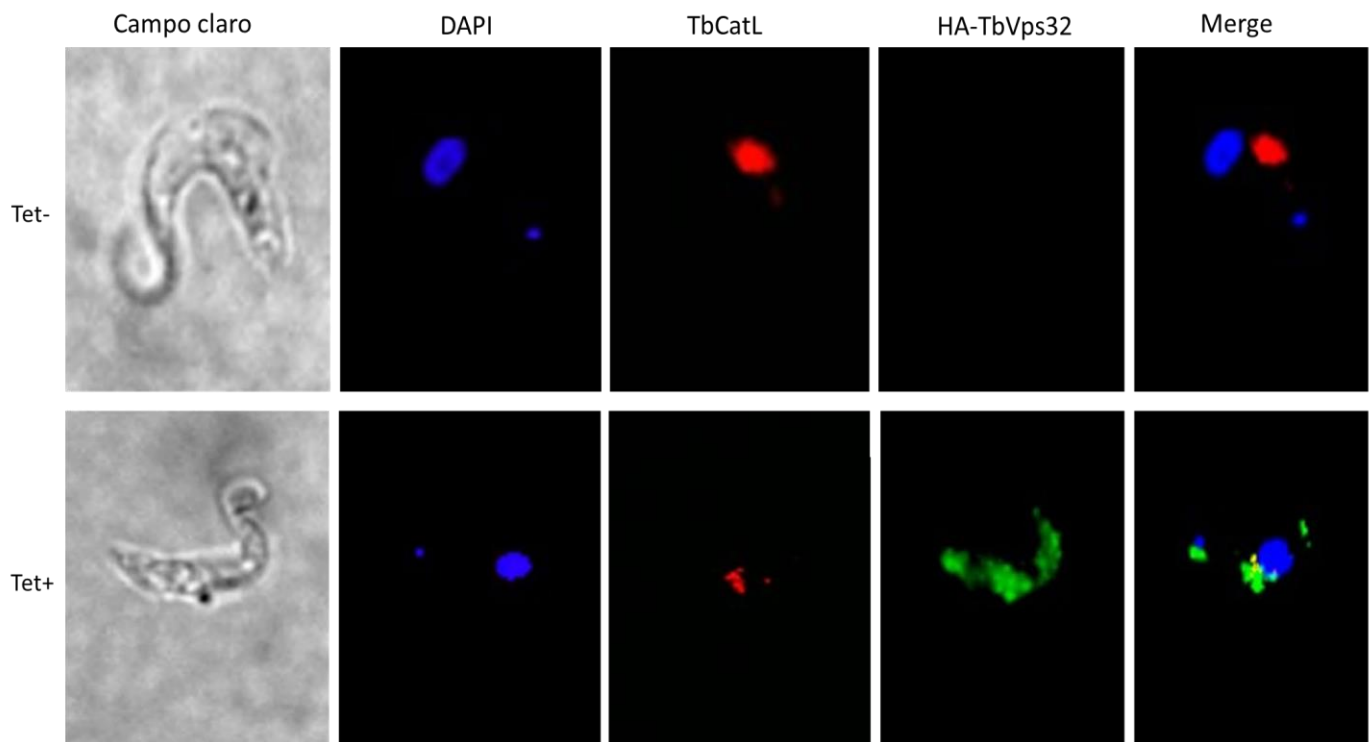


FIGURA 20. Microscopia de Fluorescencia de la línea HA-TbVps32 BSF. Los cultivos HA-TbVps32 fueron tratados con Tetraciclina durante 24 horas y luego se tomaron muestras para evaluar la localización de la proteína HA-TbVps32 y del lisosoma. Para eso, las mismas fueron teñidas con DAPI e incubadas con los anticuerpos anti-HA (verde) y anti-TbCatL (rojo). La localización de HA-TbVps32 BSF resulta ser citoplasmática y su señal co-localiza con la señal de TbCatL, es decir, con el lisosoma.

APÉNDICE II

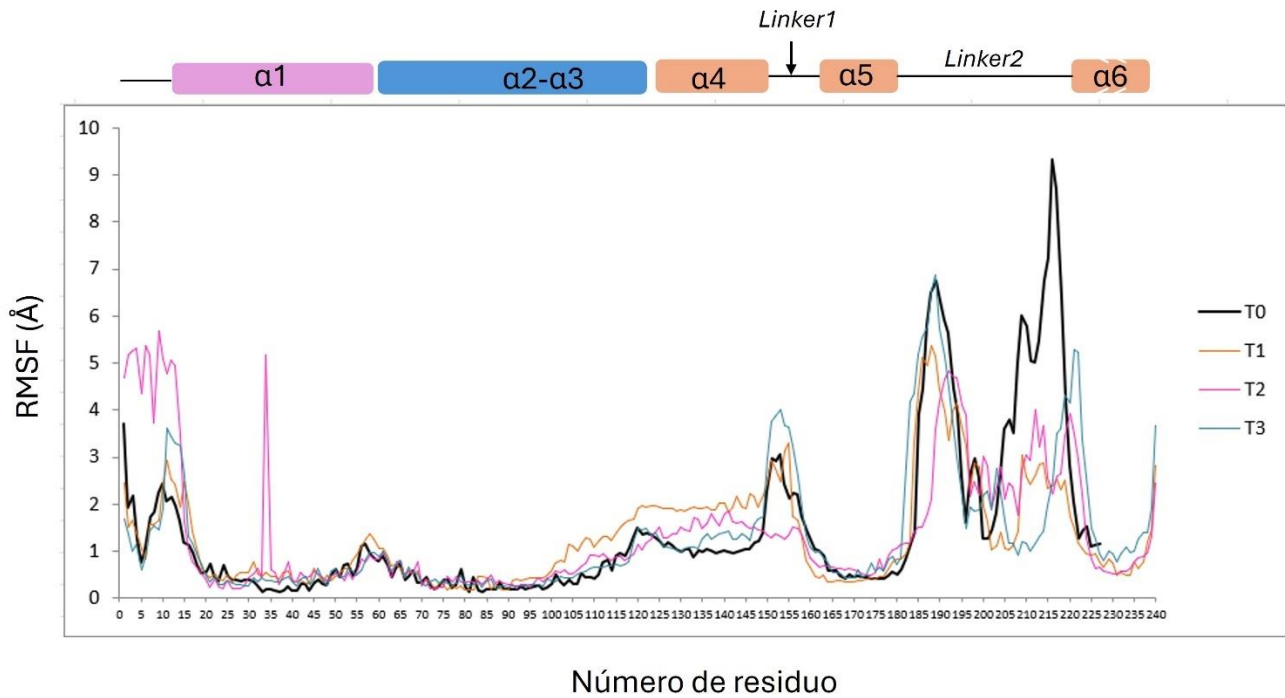


FIGURA 1. Fluctuation Plot de la dinámica de Snf7 modelo sin templado. A través de la herramienta CABSflex, se obtuvo un gráfico que relaciona a cada aminoácido con su grado de movilidad (RMSF) en un tiempo determinado (T0, T1, T2 y T3).

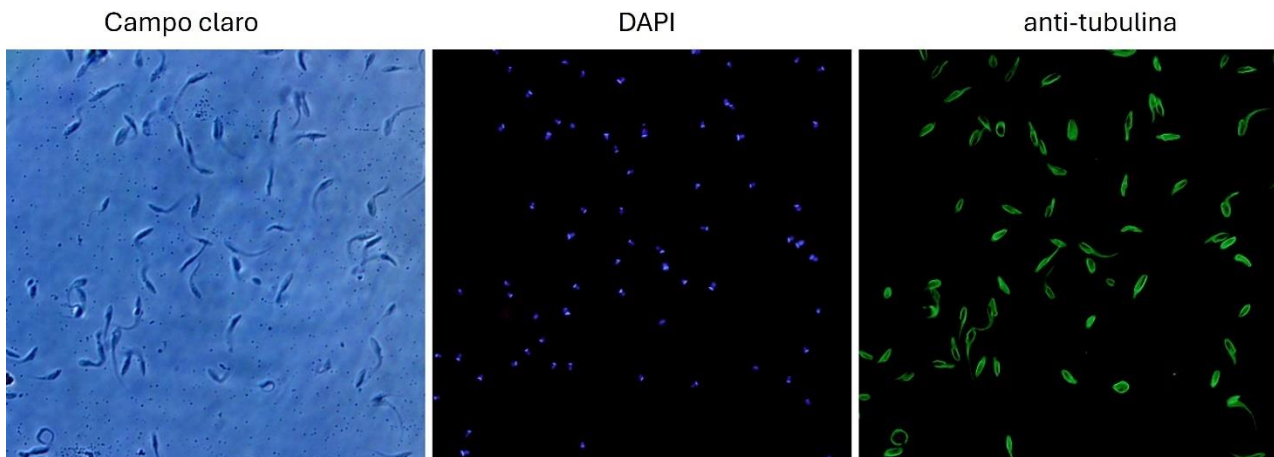
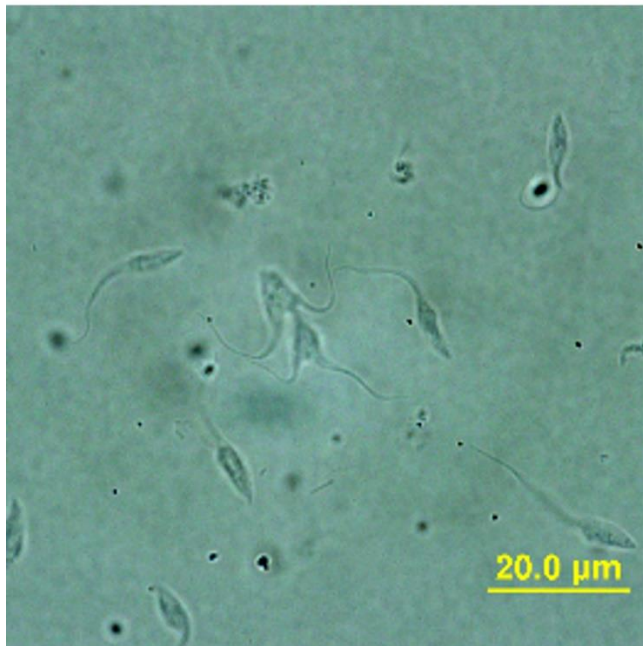


FIGURA 2. Línea celular control pRIBOTEX. A diferencia de los cultivos Vps32pRIBOTEX y HA-TbVps32, esta línea celular control proliferó normalmente y contó con morfología y fenotipos de núcleo y kinetoplastos típicos. Escala de barra: 10 μm .

Campo claro



DAPI

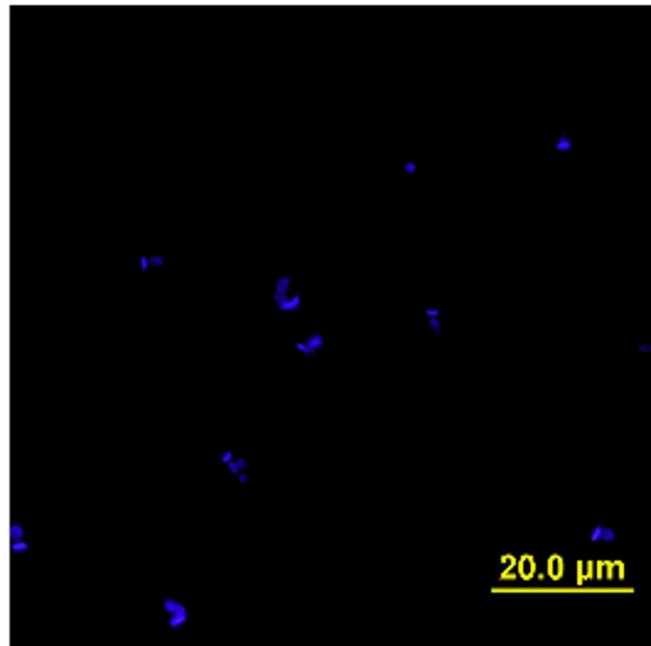


FIGURA 3. Línea celular **Vps32pRIBOTEX**. Se observan células con número atípico de núcleos y kinetoplastos (DAPI) y morfología atípica. Es notoria la presencia de células con dos flagelos.

Discusión

La maquinaria ESCRT y sus componentes proteicos han sido ampliamente caracterizados inicialmente en *S. cerevisiae* y luego en *H. sapiens* (Babst, 2011; Bankaitis et al., 1986; Coonrod & Stevens, 2010; Katzmann et al., 2001; Robinson et al., 1988). En estos organismos, esta maquinaria inicialmente fue vinculada a la formación de MVB, pero luego se demostró su participación en otros procesos como la citoquinesis, la autofagia, la reparación de las membranas e incluso en la brotación del VIH (Hurley, 2010; Martin-Serrano et al., 2005; Olmos & Carlton, 2016; Saksena et al., 2009a). En Arqueas, la función ancestral del complejo se vinculó con la abscisión celular, mediada por la participación de ESCRT-III y la ATPasa Vps4 (Samson et al., 2008b, 2008a). Asimismo, en organismos filogenéticamente distantes, como *Arabidopsis thaliana* y *Trypanosoma brucei*, se identificaron funciones conservadas en ESCRT en la regulación del tráfico vesicular y en la modulación de rutas de señalización intracelular. En conjunto, a lo largo del estudio de la maquinaria ESCRT, se consolidó la idea de que la misma constituye un módulo molecular versátil y evolutivamente conservado, cuya plasticidad funcional ha permitido su adaptación a distintos contextos celulares a lo largo de la evolución.

En *T. brucei*, la maquinaria ESCRT se encuentra conservada entre los taxones eucariotas y consta de tres subcomplejos y las proteínas asociadas (Leung et al., 2008). Si bien en este organismo han sido caracterizadas proteínas miembros de ESCRT como TbVps23 (ESCRT-I) (Silverman et al., 2013), TbVps28 (ESCRT-I) (Leung et al., 2008), la ATPasa TbVps4 (Silverman et al., 2013; Umaer & Bangs, 2020), TbVps24 (ESCRT-III) (Umaer & Bangs, 2020) y TbVps36 (ESCRT-II) (Eliaz et al., 2017), a la fecha no se encuentra un trabajo científico respecto a la proteína más abundante de ESCRT-III, la proteína Vps32 (Teis et al., 2008). En *T. cruzi*, el panorama no mejora, ya que, hasta la fecha, la investigación sobre ESCRT y, específicamente, sobre Vps32, es limitada o nula.

A la fecha, la proteína Vps32 ha sido estudiada a través de múltiples enfoques, que abarcan desde aproximaciones estructurales hasta análisis funcionales, empleando para ello un amplio espectro de herramientas tanto *in silico* como *in vitro* (Bajorek et al., 2009; Buchkovich et al., 2013; Henne et al., 2012; Huber et al., 2020; Kojima et al., 2016; Obita et al., 2007; Shim et al., 2007; Tang et al., 2015). A pesar de su complejidad estructural, su

participación en diversos procesos de remodelado de membranas continúa despertando interés, en particular respecto a los mecanismos moleculares implicados y a la interconexión funcional entre ellos. No obstante, este cúmulo de conocimientos contrasta con la escasa información disponible en tripanosomátidos, en los cuales, hasta el momento, el estudio de Vps32 no había sido abordado.

Durante el desarrollo de la presente Tesis doctoral se hallaron dos ortólogos Vps32 en tripanosomátidos: TbVps32 de *T. brucei* y TcVps32 en *T. cruzi*

Si bien la obtención de estas secuencias se sustentó en la secuencia canónica de Snf7, la estrategia empleada resultó exitosa en la identificación de genes TcVps32 y TbVps32, logrando abarcar tanto las variantes ortólogas como parálogas de Vps32. Adicionalmente, ambas secuencias presentaron el motivo característico de Snf7 y la estructura secundaria conformada por cinco hélices α y la región *Linker* del CTR. Tal como se ha mencionado, esta organización estructural, en un inicio, marcó una diferencia respecto de lo reportado para Snf7 y CHMP4, cuyas estructuras exhibían seis hélices α (Shim et al., 2007). Dicha observación fue considerada llamativa y se interpretó como una de las características particulares de ESCRT-III, dado que el número de hélices α difería entre organismos (Bajorek et al., 2009; Muzioł et al., 2006). No obstante, los estudios cristalográficos posteriores sobre Snf7 revelaron que esta proteína constaba en realidad de cinco hélices α , ya que las regiones $\alpha 2$ y $\alpha 3$ se encontraban físicamente unidas conformando una única hélice (Tang et al., 2015). En consecuencia, TcVps32 y TbVps32 no sólo compartían las mismas características de estructura secundaria que Snf7, sino que también exhibían el mismo número de hélices α .

La estructura secundaria de TcVps32 y TbVps32 mostró una distribución de cargas que permitió identificar una NTR básica y una CTR ácida (Shim et al., 2007). En este marco, un aspecto particular observado en ambas proteínas fue la naturaleza química de la hélice $\alpha 1$ de la NTR. Considerando que los autores definieron como básicas aquellas hélices con un $pI > 8$ y como ácidas aquellas con un $pI < 6$, la hélice $\alpha 1$ de TcVps32 presentó propiedades ácidas ($pI \approx 5$), mientras que en TbVps32 se observó un valor cercano a la neutralidad ($pI \approx 6,8$). Un comportamiento similar se detectó en la hélice $\alpha 6$ de la CTR de CHMP4 y en la

hélice $\alpha 3$ de CHMP6, ambas con un pI aproximadamente neutro. Aunque el rol de estas hélices ESCRT-III es desconocido, es probable que guarden algún sentido estructural en el contexto evolutivo digno de estudiarse. Más allá de estas particularidades, en conjunto, la organización de la estructura secundaria y la distribución de cargas de TbVps32 y TcVps32 resultaron concordantes con lo descrito en sus ortólogos Snf7 y CHMP4 (Shim et al., 2007). Adicionalmente, en las secuencias proteicas Vps32 de ambos tripanosomátidos se identificaron motivos característicos del complejo ESCRT-III: los MIMs, el segmento anfipático ANCHR, así como regiones específicas en las hélices NTR, incluyendo lisinas con carga positiva. Todos estos hallazgos permitieron consolidar la identificación de dos ortólogos de Vps32 en tripanosomátidos: TcVps32 en *T. cruzi* y TbVps32 en *T. brucei*. Con el objetivo inicial de dilucidar la CTR, evaluar la posibilidad de los cambios conformacionales y analizar la conservación de la NTR en TcVps32 y TbVps32, se llevaron a cabo los modelados estructurales mediante dos estrategias: por un lado, utilizando un templado PDB y, por el otro, generando una estructura a partir de la predicción matemática y de las características químicas de las secuencias proteicas insertadas (modelo sin templado).

A través de la comparación con templados de la base de datos PDB, se generaron tres Modelos Alternativos de las estructuras parciales para TbVps32 y tres para TcVps32, de los cuales, en ambos casos, el Modelo alternativo 1, cumplió con el criterio de alta calidad exhibido por el programa. Por lo tanto, el Modelo Alternativo 1 fue el modelo representativo de TcVps32 de *T. cruzi*, al tiempo que el Modelo Alternativo 1 fue el modelo representativo de TbVps32 de *T. brucei*. Ambos Modelos Alternativos 1 consistieron en estructuras parciales basadas en la estructura cristalográfica de Snf7 (PDB ID 5FD7 *open conformation A*), estructura que sólo está compuesta por la región N-terminal (NTR) de la proteína.

De manera general, las estructura de Vps24 de *S. cerevisiae* y CHMP3 de *H. sapiens*, ambos ortólogos y miembros de ESCRT-III, fueron utilizadas como templado para el Modelo Alternativo 2 (para TbVps32) y el Modelo Alternativo 3 (TcVps32). En el caso de Vps24 de

S. cerevisiae, la estructura tridimensional fue dilucidada mediante microscopía crioelectrónica y se correspondió con los filamentos helicoidales formados por la proteína Vps24 (Huber et al., 2020). Para el caso de CHMP3, la estructura cristalográfica dilucidada se extendió hasta el residuo 150 (Bajorek et al., 2009). Esto demuestra la gran complejidad que requieren las proteínas ESCRT-III para cristalizarse. En este sentido, resulta particularmente relevante destacar que, en *T. brucei*, la proteína TbVps24 sí ha sido caracterizada (Umaer et al., 2018; Umaer & Bangs, 2020), lo cual constituye un precedente valioso para el estudio estructural de Vps32 en tripanosomátidos.

El hecho que los templados PDB de los Modelos alternativos 2 y 3 sean específicamente miembros de ESCRT-III, nos permite evidenciar que TcVps32 y TbVps32 guardan relación estructural con las proteínas miembros del subcomplejo al que pertenecen, hecho muy característico y descripto (Shim et al., 2007). La evidente homología estructural que comparten los tres templados ESCRT-III, por lo tanto, nos permiten validar la calidad de los modelos y validar el criterio del software en cuanto a la elección de Snf7 PDB como templado. Es decir, los Modelos Alternativos 2 y 3 confirman la alta calidad de los modelos estructurales del Modelo Alternativo 1. Al respecto, cabe recordar que la validación del Modelo Alternativo 1 fue realizada por el programa a través de tres parámetros que permiten evaluar la calidad del mismo **(Resultados, Análisis estructural de Vps32, TABLA 1)**.

La estructura cristalográfica Snf7 PDB consiste en las hélices $\alpha1$ - $\alpha2$ - $\alpha3$ - $\alpha4$ (*core domain*), modelo que, además, demuestra unidas a las hélices $\alpha2$ - $\alpha3$, conformando una única hélice (Tang et al., 2015a). Aunque el hallazgo hubiese implicado el cambio en la nomenclatura de las hélices —donde el segmento correspondiente a las hélices $\alpha2$ - $\alpha3$ pasaría a denominarse simplemente $\alpha2$ —, por motivos de practicidad se optó por conservar la nomenclatura original, la cual también fue empleada en nuestros análisis. Las estructuras parciales de TcVps32 y TbVps32, y su comparación con el modelo cristalográfico Snf7, nos permitieron confirmar que existe un alto grado de conservación estructural del NTR en tripanosomátidos, ya que las hélices $\alpha1$ - $\alpha2$ - $\alpha3$ - $\alpha4$ de TcVps32 y TbVps32 presentaron la misma relación estructural entre hélices y la disposición espacial respecto a las de Snf7

(Resultados, Análisis estructural de Vps32, FIGURA 2). Esto resulta clave ya que, según los autores, esta región se encuentra conservada evolutivamente, lo que sugiere una importancia funcional crítica en la actividad de la proteína.

Si bien TcVps32 y TbVps32 compartieron mayor identidad de secuencia con las isoformas CHMP4A-B-C de *H. sapiens* en comparación con Snf7 de *S. cerevisiae* (TcVps32 presentó 27,3 % de identidad, y TbVps32 28,3 %), las estructuras parciales modeladas se basaron en la estructura de Snf7 de *S. cerevisiae* por homología estructural. Es decir, el programa seleccionó a la estructura Snf7 como template habiendo antes realizado una basta comparación con todas las estructuras de la base de datos PDB que, de hecho, incluía las estructuras cristalizadas de CHMP4 (en realidad, CHMP4 ha sido co-cristalizada con otras proteínas ESCRT)(Martinelli et al., 2012). No obstante, resulta relevante destacar la notable homología de secuencia del 38% entre Snf7 y la isoforma CHMP4B de *H. sapiens*, en comparación con las otras isoformas **(Resultados, Apéndice I Tabla 1).**

Para dilucidar la CTR de Vps32, que, en contraste con la NTR, muestra mayor divergencia, y se encuentra posiblemente relacionada con adaptaciones específicas de cada organismo (Lata et al., 2008; Saksena et al., 2009b; Shim et al., 2007), se procedió a generar las estructuras completas de Snf7, TbVps32 y TcVps32. De esta manera, valiéndonos de las habilidades del programa y basándonos en la homología estructural con Snf7, se procedió a generar la estructura completa de la misma para luego validar las estructuras completas de TcVps32 y TbVps32.

La validación del modelo de estructura completa de Snf7 se realizó mediante su superposición con el modelo cristalográfico Snf7 PDB, evidenciando una alta homología estructural en las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ - $\alpha 3$ NTR, así como un comportamiento dinámico característico en la hélice $\alpha 4$ **(Resultados, Análisis estructural de Vps32, FIGURA 6).** De manera análoga, la superposición del modelo completo de Snf7 con los modelos estructurales de TcVps32 y TbVps32 mostró una alta conservación estructural de la NTR, lo que respalda la validez de estos modelos predictivos **(Resultados, Análisis estructural de Vps32, FIGURA 7).** Los modelos estructurales completos de Snf7, TcVps32 y TbVps32 si

bien son completamente predictivos, mantienen un alto valor estructural, ya que fueron generados mediante *RaptorX* a partir de las propiedades intrínsecas de sus secuencias aminoacídicas, integrando parámetros fisicoquímicos, espaciales y estadísticos que permiten inferir conformaciones tridimensionales plausibles (PengCXu, 2011; Wang et al., 2016; XuC Wang, 2019). De hecho, estos modelos también fueron sometidos a la validación mediante el cálculo de los porcentajes de los residuos de la región outlier (**Resultados, Análisis estructural de Vps32, FIGURA 5**).

Tal como fue mencionado, las estructuras completas generadas para TcVps32 y TbVps32 replicaron la conservación estructural del NTR y la relación estrecha de las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ observada en el modelo Snf7 PDB (**Resultados, Análisis estructural de Vps32, FIGURA 6 y 7**). Al respecto, en un inicio podríamos haber aplicado un análisis extra para ratificar el comportamiento de la NTR de las estructuras parciales. El mismo podría haberse tratado de la simulación de las dinámicas de los Modelos Alternativos 1 de TbVps32 y TcVps32 a fin de evaluar la conservación estructural de las hélices NTR, teniendo en cuenta que la estructura generada por el programa representa “un momento” en el tiempo de la estructura. Sin embargo, en vez de ello, la generación de las simulaciones de las dinámicas de Snf7 PDB y de los modelos de proteína completa de TcVps32, TbVps32 y Snf7, demostraron que las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ se mantienen en la misma disposición espacial durante el transcurso de la dinámica (**Resultados, Análisis estructural de Vps32, FIGURA 10, 11 y 12**). Por lo tanto, las coincidencias estructurales entre estos modelos, no hace más que confirmar, en suma, la gran conservación estructural de la NTR. Asimismo, es sugestivo pensar acerca de la aparente conservación funcional de esta región a lo largo de la evolución.

Este comportamiento poco dinámico de la NTR y evidente a través de las dinámicas, matemáticamente fue descripto a través del cálculo de orden y flexibilidad (**Resultados, Análisis estructural de Vps32, FIGURA 8 y 13**). Esta región, como tal, exhibió un alto grado de orden y de rigidez, exceptuando de ello a la región que abarca ANCHR (desordenada y flexible). De tal manera, esta relación flexibilidad-orden fue un comportamiento observado en todas las dinámicas de todas las estructuras, lo cual podría confirmar la conservación

funcional.

Más allá de su naturaleza desordenada y flexible, a través del análisis bioinformático se identificó el motivo ANCHR compuesto por aminoácidos conservados, cuya secuencia de características anfipáticas, presentaba una disposición de aminoácidos similar a la reportada en otros organismos (Buchkovich et al., 2013) **(Resultados, Búsqueda y detección de genes Vps32, FIGURA 3B.1.2.)**. Si bien el hallazgo de ANCHR en TcVps32 y TbVps32 podría indicar que ambas conservan la capacidad de anclarse a la membrana, resulta imposible determinar si existe o no la conservación del mecanismo de inserción a la membrana través de las herramientas bioinformáticas aplicadas. De hecho, se ha reportado que las proteínas ESCRT-III poseen otras estructuras participantes en este proceso, como las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (Buchkovich et al., 2013; Muzioł et al., 2006).

Respecto a la hélice $\alpha 1$, se ha reportado que proteínas como Vps2 y Vp24/CHMP (ESCRT-III) presentan aminoácidos con cargas positivas que sirven de interfaz de interacción con la membrana de los endosomas durante el proceso de anclaje (Buchkovich et al., 2013). Los autores concluyeron que, a pesar de presentar una carga positiva moderada que podría favorecer la interacción, la hélice $\alpha 1$ de Snf7 no participa directamente en la asociación con las membranas, de modo que el mecanismo de anclaje que la involucra se limita a otras proteínas ESCRT-III (Buchkovich et al., 2013). No obstante, dado que las subunidades de ESCRT-III emplean múltiples interfases hidrofóbicas y electrostáticas para interactuar con las membranas endosomales, los mismos estudios señalaron que no podría descartarse que Snf7 actúe mediante un mecanismo alternativo. En consecuencia, su contacto directo con la membrana permaneció incierto (Tang et al., 2015; Buchkovich et al., 2013). Por lo tanto, que las cargas positivas de la hélice $\alpha 1$ de Snf7 no participen directamente en la interacción con las membranas no descarta la posibilidad de que dichas cargas contribuyan funcionalmente a este mecanismo, incluso, en las proteínas Vps32 de *T. cruzi* y *T. brucei*. De hecho, es posible que TcVps32 y TbVps32, mediante las cargas positivas localizadas en la hélice $\alpha 1$, puedan cumplir esta función atribuida a ESCRT-III, especialmente considerando la divergencia de estas cargas exhibida en Snf7, al igual que en la secuencia MIM (Obita et al., 2007).

De todos modos, el comportamiento de la hélice $\alpha 1$ introduce lo observado en las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$. Debido a la relevancia de Snf7 como subunidad de ESCRT-III más abundante, los autores profundizaron el estudio sobre las regiones involucradas en la interacción con las membranas determinando que, en ese proceso, las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ cumplen el rol principal (Teis et al., 2008). Según el modelo, la asociación a la membrana se lleva a cabo a través de los residuos de lisina de carga positiva ubicadas en dichas hélices (Buchkovich et al., 2013). Por lo expuesto hasta aquí, la similitud estructural y espacial de la NTR—que incluye el *core domain* y el motivo ANCHR—, junto con la presencia de residuos de lisina en las hélices correspondientes de TbVps32 y TcVps32 (**Resultado, Análisis estructural Vps32, FIGURA 22**), sugiere una posible conservación de los mecanismos de inserción a las membranas descritos en organismos modelo como *S. cerevisiae* y *H. sapiens*, posiblemente mediada por dichas lisinas de carga positiva. Sin embargo, resta mucho por estudiar, no sólo respecto al anclaje sino al mecanismo y al orden secuencial del reclutamiento de ESCRT a las membranas. Al respecto, es necesario recalcar que pueden surgir diferencias en el proceso de anclaje entre lo descrito en Snf7 y los tripanosomátidos debido a que las membranas difieren bioquímicamente entre organismos (**Introducción, Sección 5.1.2 Membrana plasmática y transporte vesicular**).

Los modelos estructurales completos fueron fundamentales para evaluar la CTR no sólo de TcVps32 y TbVps32 sino de Snf7, región que no ha sido dilucidada por cristalografía de Rayos X (Tang et al., 2015). La comparación de los modelos nos confirmó el dinamismo y la divergencia del CTR, ya que fueron notables las diferencias en la orientación espacial entre modelos (**Resultados, Análisis estructural de Vps32, FIGURA 11 y 12**). Por lo que, paradójicamente, esta región mantendría una variabilidad estructural constante que caracteriza a cada organismo (Lata et al., 2008; Saxena et al., 2009a; Shim et al., 2007). Según nuestros resultados, este comportamiento dinámico podría estar ligado a su alto grado de desorden y flexibilidad (**Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 13 y 15**). Antes de presentar los resultados del análisis de CTR de los modelos generados, es fundamental considerar una limitación inherente de la cristalografía de rayos X en la

resolución de regiones estructuralmente desordenadas y que condice con nuestros resultados. Este método requiere regiones conformacionalmente estables para permitir la formación de cristales adecuados. En este contexto, la ausencia de estructura cristalográfica de la NTR —donde se localiza el motivo ANCHR— y del CTR de Snf7 puede atribuirse a su carácter intrínsecamente desordenado y flexible. Respecto a la región que abarca el ANCHR, la observación es consistente con estudios previos que han demostrado que las regiones ubicadas en los extremos N- terminales, particularmente los primeros cinco residuos, tienden a carecer de estructura tridimensional definidas bajo condiciones fisiológicas, lo que dificulta significativamente su cristalización (Tang et al., 2015). Por lo tanto, nuestros resultados respecto al desorden y la flexibilidad fueron coincidentes con la dificultosa cristalización de estas regiones.

En la CTR, es destacable el comportamiento observado de la hélice $\alpha 4$ de todas las estructuras (Snf7 PDB, Snf7, TbVps32 y TcVps32) **(Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 4, 10 y 11)**. Al respecto, se ha reportado que durante las variaciones conformacionales de Snf7, la hélice $\alpha 4$ cambia su ángulo de orientación con respecto a las hélices $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ (Tang et al., 2015). Si bien no hay estudios estructurales adicionales al respecto, nuestros resultados destacan que la hélice $\alpha 4$ es la única hélice ordenada y flexible, y que, a lo largo de las dinámicas, pareciese mantener separadas estructuralmente al NTR y al CTR **(Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 9,13 y 14)**. Los cambios de orientación la hélice $\alpha 4$ pueden evidenciarse con mayor claridad en las dinámicas, en las cuales se observa que esta hélice es la única que presenta variaciones bruscas en su flexibilidad inmediatamente después de una NTR sumamente rígida/ordenada **(Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 8, 9, 13 y 15)**. Por lo tanto, la hélice $\alpha 4$, podría ser clave durante los cambios conformacionales ya que, asimismo, parece definir las regiones de la proteína **(Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 10, 11 y 14)**. De hecho, tal como se ha mencionado los cambios en los ángulos de torsión de esta hélice respecto a las hélices $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$, se relacionan con el estado conformacional cerrado de Snf7 y la interacción de residuos específicos de estas hélices (Tang et al., 2015). Si bien identificamos residuos que podrían ser partícipes de las interacciones, debido a que las

interacciones entre aminoácidos se analizan a partir de modelos estructurales en su conformación cerrada, nos es dificultoso aseverar o descartar la posibilidad de las interacciones entre las hélices mencionadas de TbVps32 y TcVps32 (**Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 24**). Mas bien, la presencia de estos aminoácidos, la dinámica, la flexibilidad y orden de la hélice $\alpha 4$, podría ser indicativo que la misma es una pieza clave durante los cambios conformacionales.

A través del análisis bioinformático, se reconocieron los motivos MIM hacia el CTR. El hallazgo de MIM-1-like podría sugerirnos que ambas proteínas Vps32 en estos tripanosomátidos tienen la capacidad de asociarse a miembros de otros subcomplejos de una manera secuencial o alternativa (Campsteijn et al., 2016; Wollert & Hurley, 2010). Al momento, no hay estudios al respecto en *T. brucei*, sin embargo, ya fueron identificados miembros de los subcomplejos ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III (Eliaz et al., 2017; Leung et al., 2008; Silverman et al., 2013; Umaer et al., 2018; Umaer C Bangs, 2020).

Por otro lado, la identificación del MIM-2 posicionado sobre el *Linker* CTR (Kojima et al., 2016; Shen et al., 2014; Tang et al., 2015), nos sugiere la conservación del mecanismo regulatorio de Vps32 llevado a cabo por la ATPasa Vps4. En *T. brucei* BSF, TbVps4 ha sido encontrada en asociación con los endosomas tardíos, siendo clave para el desarrollo normal de la vía biosintética y endocítica a través de los MVB, con un distinguido rol en el reciclaje de ISGs hacia la superficie celular (Leung et al., 2008; Silverman et al., 2013). De hecho, en estos organismos se ha descrito que la maquinaria ESCRT además de participar del reclutamiento de proteínas ubiquitinadas, participa del reciclaje de proteínas a través del papel central de TbVps24 (Umaer C Bangs, 2020). Si bien no hay estudios que vinculen a TbVps32 o TcVps32 con TbVps4, es evidente que pueda desarrollarse la regulación a través de MIM-2.

Un aspecto muy llamativo fue el posicionamiento de MIM-2 sobre el *Linker*, rodeado por las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$, en una especie de “bolsillo” o región “protegida” (**Resultados, Análisis de estructura Vps32, FIGURA 20**). Esto da la apariencia de constituir una región muy controlada. Estas observaciones sobre las hélices se sustentan además con la literatura, según la cual, la hélice $\alpha 5$ descrita como autoinhibitoria, se posiciona por encima del core

domain durante el estado conformacional cerrado de Snf7 (Tang et al., 2015). Es decir, la hélice $\alpha 5$ cambia de posición con los cambios conformacionales. La disposición espacial de esta hélice rodeando el MIM-2 también se replica en el modelo completo de Snf7. Al respecto, según nuestros resultados, la naturaleza flexible y desordenada de la hélice $\alpha 5$ evidente en las dinámicas de TcVps32 y TbVps32 (**Resultados, Análisis de estructura Vps32, FIGURA 15**) podrían explicar su comportamiento dinámico y variable, aspectos claves para que se puede llevar a cabo los cambios de posición descripto.

Adicionalmente, se ha reportado que, para que ocurran tal versatilidad estructural descrita en torno al core domain y la hélice $\alpha 5$, es necesaria una región *Linker* sumamente flexible que conecte esta hélice con la hélice $\alpha 4$ (Shen et al., 2014). La gran flexibilidad calculada para el *Linker* también se hace evidente en dinámicas de ambas proteínas (**Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 15**). En suma, la disposición espacial de la hélice $\alpha 5$ y el *Linker* podrían responder a un mecanismo sinérgico entre las partes. Por lo tanto, según nuestros resultados, podría inferirse que TcVps32 y TbVps32 podrían ser capaces de experimentar los cambios conformacionales que han sido reportados en Snf7 de *S. cerevisiae* y CHMP4 de *H. sapiens*. Si a la identificación de MIM-2, las características flexibles de la hélice $\alpha 5$ y del *Linker* CTR añadimos la caracterización funcional de la ATPasa TbVps4 de *T. brucei* (Silverman et al., 2013), entonces sugerimos que es posible la existencia de una regulación ejercida sobre TbVps32 y TcVps32 que incida sobre la alternancia conformacional en estos tripanosomátidos. Aunque la ATPasa Vps4 no ha sido identificado ni caracterizado en *T. cruzi*, la presencia del motivo MIM-2 sugiere que este mecanismo regulatorio podría estar conservado en este organismo.

Sobre la región tan flexible y desordenada que caracteriza al *Linker* de TcVps32 y TbVps32 no fue hallado el elemento INS que caracteriza a la isoforma CHMP4C descrita como efectora en la abscisión de membranas y participante clave en el punto de control de la citoquinesis (**Resultados, Búsqueda y detección de genes Vps32 en *T. cruzi* y *T. brucei*, FIGURA 13**) (Capalbo et al., 2012; Carlton et al., 2012). En este punto, Snf7 de *S. cerevisiae* también carece de esta inserción por lo que sus funciones podrían no estar relacionadas a

las de CHMP4C y ser compatibles con las de CHMP4A-B (**Resultados, Búsqueda y detección de genes Vps32 en *T. cruzi* y *T. brucei*, FIGURA 14**). La ausencia de esta inserción compuesta por aminoácidos de serina fosforilables por la Aurora quinasa B, podría sugerir que TcVps32 y TbVps32 no son proteínas fosforeguladas para llevar a cabo la abscisión de la membrana durante la citoquinesis celular o, que directamente, estas proteínas no poseen un rol regulatorio en la división celular. Sin embargo, de existir alguna participación directa por parte de TcVps32 y TbVps32 en la regulación del ciclo celular en tripanosomátidos, ésta puede deberse a otros mecanismos no relacionados e independientes de la Aurora quinasa B.

En suma, los resultados obtenidos sugirieron la conservación funcional de las NTR y CTR de Vps32 de *T. cruzi* y *T. brucei*. Por extensión, consideramos que TbVps32 y TcVps32 constituyen proteínas dinámicas con capacidad de alternar en sus estados conformacionales, tal como había sido descripto principalmente en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. Sumado a ello, la conservación de motivos funcionales respecto a Snf7 y CHMP4, demuestran que TcVps32 y TbVps32 podrían ejercer funciones propias de la maquinaria ESCRT. Por tanto, estas proteínas actúan potencialmente sobre las membranas. Específicamente, La ausencia del INS en TcVps32 y TbVps32, junto con su mayor identidad de secuencia con CHMP4A (33,8% y 33,9% de identidad, respectivamente) y CHMP4B (33,3% y 31, 5%, respectivamente) respecto a CHMP4C (29,3%), sugiere que estas proteínas podrían desempeñar funciones análogas a las isoformas CHMP4A y CHMP4B. Esta hipótesis se refuerza al considerar que Snf7 de *S. cerevisiae*, que también carece del INS, muestra mayor homología con CHMP4A y CHMP4B (**Resultados, Apéndice I, Tabla 3**), desempeñando funciones equivalentes en el contexto de ESCRT-III. Adicionalmente, la alta conservación estructural de TcVps32 y TbVps32 con Snf7 sugiere que estas proteínas podrían desempeñar funciones enfocadas en el remodelado de membranas y la formación de MVB, sin participar en la regulación directa y/o específica de la citoquinesis asociada a CHMP4C.

Sintéticamente, Snf7 se encuentra asociada al proceso de biogénesis de las ILVs y la

consecuente formación de MVB, a la clasificación y la incorporación de proteínas ubiquitinadas hacia vesículas internas del endosoma, posteriormente dirigidas a la vacuola para su degradación (Henne et al., 2011). Es decir, Snf7 tiene un claro rol en el transporte endocítico. Sin embargo, también ha sido implicada en el cierre de la envoltura nuclear postmitótica, eventos de autofagia tardía, y en la esporulación (Webster et al., 2014; Schöneberg et al., 2017). Las funciones de Snf7 en el transporte fueron coincidentes con los reportes en torno a la maquinaria ESCRT de *T. brucei*. Por esta razón, se consideró que Vps32 de ambos tripanosomátidos tendrían un rol central en el transporte endocítico hacia el lisosoma. De hecho, no se descartó que la misma participe de otras vías endocíticas, como la de reciclaje, ya que dos proteínas ESCRT de *T. brucei* BSF, TbVps23 y ATPasa TbVps4, mostraron su participación en esta vía (Leung et al., 2008; Silverman et al., 2013; Umaer C Bangs, 2020). Respecto a TcVps32 de *T. cruzi*, la significativa homología de secuencia entre TbVps32 y TcVps32, junto con su alta conservación estructural, sugiere que TcVps32 podría desempeñar funciones análogas a las de TbVps32 ya que, además, ESCRT se encuentra conservado en este organismo (Leung et al., 2008). Cabe destacar que, a la fecha, es el único reporte respecto a ESCRT en este tripanosomátido.

En *T. cruzi* se llevó a cabo la sobreexpresión proteica de TcVps32 mediante dos vectores de distinto potencial de expresión: pTREX y pRIBOTEX, por lo tanto, se obtuvieron las líneas celulares HA-TbVps32pRIBOTEX y Vps32pTREX. En cuanto a la línea celular HA-TcVps32pRIBOTEX, la expresión de la proteína HA-TcVps32 fue evidenciada mediante WB, observándose una banda de aproximadamente 35 kDa, siendo 26 kDa el PM teórico. Si bien este resultado fue sorpresivo y desalentador en un inicio, fue coincidente con lo reportado en *C. elegans*. Al respecto, un extracto proteico compuesto por la proteína recombinante Vps32 sometido a una cromatografía de exclusión molecular y luego al fraccionamiento por densidad de gradiente de glicerol, permitió aislar un pool de

monómeros Vps32 cuyo PM aparente fue de 33 kDa, siendo el PM teórico igual a 25 kDa (Shen et al., 2014). En este contexto, sin considerar el tag de hemaglutinitina (HA), el PM de

TcVps32 se aproximaba a los 34 kDa. Este resultado acompañado de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia nos permitió confirmar que los cultivos HA-TcVps32pRIBOTEX expresaban la proteína de interés y comenzó a darnos indicios sobre el estado conformacional de la misma: una conformación monomérica o inactiva (Shim et al., 2007).

En lo que respecta a la línea celular Vps32pTREX, si bien no fue posible confirmar la expresión de TcVps32 en los cultivos, pudimos identificar morfologías y características celulares particulares, las cuales constituyeron resultados relevantes, ya que el objetivo principal de la implementación de dos estrategias de sobreexpresión simultáneamente consistía en evidenciar el efecto diferencial de los niveles de sobreexpresión e inferir acerca del rol de Vps32 en la biología del parásito. Según nuestros resultados, quedó claro que tanto la sobreexpresión constitutiva de HA-Vps32pRIBOTEX como la de Vps32pTREX alteraba la viabilidad de los parásitos, los cuales, además presentaron contenido de DNA aberrante y morfologías atípicas de manera diferencial. Al respecto, tanto los cultivos HA-TcVps32pRIBOTEX como los cultivos Vps32pTREX mostraron células biflageladas, pero estos últimos, además, mostraron flagelos cortos y prolongaciones. Es decir, confirmamos que el desarrollo de un patrón morfológico diferencial producto de los diferentes niveles de expresión de TcVps32. Al respecto, presumiblemente, las líneas celulares Vps32pTREX reflejaron el fenotipo más extremo de expresión de TcVps32. Por lo tanto, los fenotipos observados en ambos cultivos derivan de la sobreexpresión de TcVps32.

Fue descartada alguna incidencia del vector en los efectos observados, ya que los cultivos control no mostraron alteraciones morfológicas ni anomalías en el contenido de ADN **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TcVps32 de *T. cruzi*, FIGURA 5 y FIGURA 6)**. Asimismo, se descartó que los efectos negativos observados en los cultivos fueran consecuencia de la incorporación de la etiqueta HA en el extremo N-terminal de TcVps32. Esto se corroboró al generar líneas celulares sobreexpresantes de TcVps32pRIBOTEX sin tag HA, las cuales mostraron alteraciones proliferativas equivalentes a las observadas en la línea celular HA-Vps32pRIBOTEX.

Desde las etapas iniciales de la investigación, la estrategia de adición del tag HA en el N-terminal de TcVps32 se encontró respaldada por lo descrito en Vps32 de *C. elegans* (Shen et al., 2014) y en TrypTag. Esta base de datos no sólo describía la localización subcelular de proteínas, sino que especificaba el efecto de la expresión de la misma con un tag en un extremo terminal u otro. Al respecto, se había reportado que no se había obtenido desarrollo de cultivos ante la adición del tag en el C-terminal de Vps32 de *T. brucei*. Respecto a Vps32 de *C. elegans*, los mismos autores que describieron el comportamiento de Vps32, demostraron que el agregado de una etiqueta de hexahistidina en la CTR, alteraba la capacidad de la proteína de generar polímeros espontáneamente. Y, por tanto, concluyeron que la presencia de un epítipo corto y cargado en la CTR impedía el ensamblaje del filamento, inhibiendo potencialmente las asociaciones intermoleculares (Shen et al., 2014). En conclusión, teniendo en cuenta estos reportes y los resultados obtenidos, pudimos determinar que los fenotipos observados en ambos cultivos derivan de la sobreexpresión de TcVps32 y no se deben al vector utilizado ni a la adición de una etiqueta en el N-terminal de TcVps32. Más bien reforzamos nuestra elección criteriosa de adicionar el epítipo HA en este terminal de TcVps32 de *T. cruzi*.

En todos los cultivos fue evidente la pérdida de la capacidad proliferativa aun sin la necesidad de construir curvas de crecimiento. Si bien esto dificultó el estudio de proteína también respaldó la hipótesis de que TcVps32 es una proteína esencial para *T. cruzi*.

Tal como se mencionó previamente, los cultivos HA-TbVps32pRIBOTEX y Vps32pTRES mostraron morfologías aberrantes y alteraciones en el contenido de ADN, observaciones que también se extendieron a los cultivos que sobreexpresaban las versiones truncadas de HA-TcVps32 en su CTR, las cuales podrían estar ejerciendo un efecto dominante negativo. Si bien estos cultivos presentaron una gran heterogeneidad y fue obtenida una muy baja proporción de parásitos transgénicos sobreexpresantes de las distintas versiones de TcVps32, los resultados obtenidos fueron relevantes por dos razones principales: en primer lugar, a las configuraciones núcleo-kinetoplasto (N-K) atípicas, se le sumaron células con anomalías morfológicas diferenciales entre los cultivos analizados; y en segundo lugar, se observaron diferencias en el patrón de marcación correspondiente a HA-

TcVps32. Ello tiene relevancia en el contexto de una proteína TcVps32 cuyo CTR había sido deletado.

Para simplificar el análisis de estos cultivos en cuanto a su nomenclatura, los cultivos $\Delta 5y6LTcVps32pRIBOTEX$, que carecen de las hélices $\alpha 5-\alpha 6$ y el *Linker*, serán identificados como TcVps32 *core* (versión de TcVps32 posee las hélices $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4$). Por lo tanto, esta construcción representa la expresión de la región *core domain* ($\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-\alpha 4$) de TcVps32 (Muzioł et al., 2006; Tang et al., 2015). Asimismo, los cultivos HA- $\Delta 6LVps32pRIBOTEX$ que carecen de la hélice $\alpha 6$ y el *Linker* y, por lo tanto, sólo presenta las hélices $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-\alpha 4-\alpha 5$, será identificado como TcVps32($\alpha 1-\alpha 5$).

En cuanto a las anomalías morfológicas, mientras que en los cultivos HA-TcVps32pRIBOTEX y Vps32pTREX se observaron células biflageladas, en estos últimos, además, se observaron flagelos cortos y prolongaciones. Por otro lado, en los cultivos TcVps32*core* y TcVps32($\alpha 1-\alpha 5$) se observaron células con prolongaciones y adicionalmente, en este último, se observaron células con flagelos cortos.

Respecto a la marcación de la proteína, los cultivos HA- TcVps32pRIBOTEX exhibieron la marca correspondiente a TcVps32 en el citoplasma celular entorno al núcleo y al kinetoplasto (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TcVps32 de *T. cruzi*, FIGURA 3**), la cual coincidía con los reportes de la base de datos TrypTag (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TcVps32 de *T. cruzi*, FIGURA 4**). Es decir, HA-TcVps32 de *T. cruzi* mostraba una localización compatible con los endosomas de la vía endocítica. Sin embargo, la proteína también se registró en el interior de los flagelos.

Aun considerando las limitaciones mencionadas respecto a la heterogeneidad y proliferación de estos cultivos, el patrón de localización de la proteína de la línea celular sobreexpresante HA-TcVps32pRIBOTEX, es decir, la versión completa de TcVps32, sirvió como material de referencia para comparar y evaluar los cambios en la distribución y el patrón de la marca de la proteína tras la delección de la CTR. Al respecto, los cultivos sobreexpresantes TbVps32*core*, mostraron la marca HA-TcVps32 en el citoplasma y el flagelo. Para el caso de los cultivos TbVps32 $\alpha 1-\alpha 5$, la marca se localizó únicamente en el

citoplasma. Preliminarmente, estos resultados demostrarían la relevancia de la CTR como región reguladora de la proteína.

Con respecto al cultivo TcVps32_{core}, este representa biológicamente la estructura parcial de TcVps32 obtenido mediante el modelado (Modelo Alternativo 1) a partir del templado Snf7 PDB (**Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 2**), es decir, podría representar la estructura que se obtendría por cristalografía de TcVps32. Curiosamente fue el cultivo que mejor pudo proliferar respecto a los cultivos de las construcciones restantes, lo cual puede deberse a que justamente, es la región más conservada, ordenada y rígida de TcVps32, y, por lo tanto, con mayor estabilidad estructural (**Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 7, 8, 12 y 13**). En estos cultivos, fue llamativo que la marca HA-TcVps32 se encuentre más focalizada a lo largo del flagelo (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TcVps32 de *T. cruzi*, FIGURA 8**), formando una “línea” en vez de mantenerse como puntos aislados (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TcVps32 de *T. cruzi*, FIGURA 3**), tal como se observa en los cultivos HA-TcVps32pRIBOTEX sobreexpresantes de la versión completa de la proteína. En estos últimos cultivos, la localización de HA-TcVps32 en los flagelos podría interpretarse como una deslocalización de la proteína producto de la sobreexpresión. Esto, considerando los reportes en *T. brucei* respecto a Vps32, los cuales restringían su localización a los endosomas.

Adicionalmente, en los cultivos TcVps32_{core}, la marca focalizada a lo largo del flagelo podría interpretarse como una deslocalización de la proteína que podría deberse a la interrupción de su CTR. La CTR de Snf7 es crucial para su interacción con la ATPasa Vps4, necesaria para el desensamblaje y reciclaje del complejo ESCRT-III, por lo tanto, la ausencia de este dominio podría impedir esta interacción. Esto podría contribuir a la acumulación de esta versión de TcVps32 en las membranas, tal como fue reportado para otras versiones truncas de los miembros de ESCRT-III estudiados (Shim et al., 2007). La explicación que se acopla a esta idea se refiere a las características estructurales de esta construcción: a pesar de que se observa un efecto negativo en la proliferación de los cultivos TcVps32_{core}, es probable que el mínimo porcentaje de parásitos viables opere y mantenga ciertos

mecanismos de transporte utilizando una TcVps32 activa a expensas del *core domain*. Respecto a ello, tal como se ha mencionado oportunamente, la región *core domain* de Snf7 fue cristalizada en su forma activa, lista para comenzar la transición desde un monómero soluble en el citoplasma hacia un polímero funcional en la membrana. Inicialmente, esto constituyó un hallazgo sorprendente para los autores, ya que, en lugar de adoptar una estructura rígida de cuatro hélices superenrolladas, el *core domain* de Snf7 había experimentado una reorganización conformacional que exponía una superficie de unión catiónica a la membrana y superficies hidrofóbicas y electrostáticas de interacción con proteínas para la polimerización (Tang et al., 2015). Es decir, esta estructura actuaba como una proteína Snf7 activa con capacidad de fijación a la membrana. Respecto a ello, se destaca la identificación de los residuos de lisina de carga positiva en las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de TcVps32 y TbVps32, que servirían de interfaz de interacción con las membranas **(Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 22)**.

Por tanto, el cambio de localización de la versión TcVps32*core* podría deberse a que constituye una versión activa constitutivamente de Vps32. Sin embargo, la posibilidad de una proteína TcVps32 activa focalizada en el flagelo, nos plantea un interrogante respecto a si realmente constituye un fenómeno de deslocalización de la proteína por la sobreexpresión y/o si es probable que haya un efecto vinculado con el transporte intraflagelar (IFT) (Qin et al., 2004). De todas las suposiciones que pueden realizarse, consideramos que el transporte endocítico puede estar alterado ya que estos cultivos sobreexpresan una proteína TcVps32 activa de manera constitutiva. Si TcVps32*core* activa se posiciona en el flagelo como resultado de su sobreexpresión y de la delección del dominio CTR, es probable que el transporte endocítico esté afectado ya que la proteína no se encuentra en su localización subcelular normal o fisiológica. Esta redistribución subcelular podría tener múltiples implicancias funcionales. En este caso, por la evidencia en imágenes, la afectación del transporte endocítico podría comprometer indirectamente el IFT. Asimismo, no puede descartarse que TcVps32*core* activa se asocie de forma inespecífica con membranas del flagelo, generando disfunciones simultáneas tanto en la vía endocítica como en el IFT. Por último, es posible que la deslocalización de TcVps32*core*

al flagelo constituya un mecanismo compensatorio frente a una disfunción primaria del sistema endocítico. Si bien no hay reportes que vinculen a ESCRT con el IFT, el cambio de localización de TcVps32*core* hacia el flagelo podría indicar el posible desarrollo de un mecanismo de transporte alternativo o compensatorio, probablemente, para mitigar daños en el mismo y/o el transporte endocítico. Por lo tanto, no se puede determinar si la presencia de TcVps32*core* en el flagelo sea causa o consecuencia de la alteración de la endocitosis o si se desarrolla como mecanismo compensatorio.

El flagelo es una estructura dinámica, en la que los microtúbulos y las proteínas anexas se renuevan constantemente para mantener la longitud y arquitectura de los flagelos (Fridberg et al., 2007; Kohl et al., 2003; Marshall & Rosenbaum, 2001). Esto lo logra gracias al IFT que se desarrolla bidireccionalmente para transportar proteínas axonemales y flagelares. De hecho, el bolsillo flagelar, zona en la que confluyen la exocitosis y la endocitosis, mantiene su arquitectura gracias a la integridad del flagelo y la misma se mantiene gracias al IFT (Kohl et al., 2003). Ante condiciones de estrés (cambios de temperatura, pH, presión osmótica o privación de nutrientes), los tripanosomas ajustan sus mecanismos de transporte para adaptarse y preservar funciones esenciales (Matthews, 2005; Natesan et al., 2007). Aunque no hay reportes que vinculen al transporte endocítico con el IFT o que demuestren un aumento del IFT en condiciones de estrés, sería razonable suponer que los cambios en los mecanismos de transporte celular también podrían afectar a este tipo particular de transporte. Por lo tanto, si la alteración del transporte endocítico afecta el IFT, consecuentemente, este afectaría el ciclo celular por su incidencia sobre los flagelos. La arquitectura correcta de los flagelos incide también sobre la división celular, específicamente en la fase S para la generación y elongación de los mismos, y en la citoquinesis, por la tracción mecánica que generan estas estructuras para la escisión final y la división de la célula (Albisetti et al., 2023; Sunter & Gull, 2016) **(Introducción, Sección 5.5.3.1 Citoquinesis en *T. brucei*: rol del corset subpelicular, FIGURA 35)**. En este contexto, en los cultivos TcVps32*core* no se observan células biflageladas, pero sí con contenido aberrante de DNA, con lo cual es evidente la alteración

del ciclo celular. Además, se ha reportado que la alteración de la arquitectura de los flagelos desordena el bolsillo flagelar, lo cual afecta el flujo del transporte vesicular y los mecanismos de transporte, los cuales podrían ser los responsables de los defectos en el ciclo celular (Albertson et al., 2005a; Albisetti et al., 2023; Andrade et al., 2022; Frémont & Echard, 2018; Hammarton et al., 2007; Kohl et al., 2003; Sunter et al., 2015; Sunter & Gull, 2016). Por lo tanto, existe la posibilidad que las anomalías celulares observadas se produzcan por la afectación del transporte intracelular, principalmente el endocítico, pero presumiblemente también del IFT.

Se ha demostrado que el IFT participa en el tráfico vesicular y en la exocitosis en células no ciliadas (Baldari C Rosenbaum, 2010a). Asimismo, en células ciliadas, se ha propuesto que el IFT puede modular procesos como la secreción de vesículas en el cilio, proponiendo funciones secretoras para esta estructura (Baldari C Rosenbaum, 2010b). En este contexto, en *T. rangeli* se ha demostrado la secreción de EVs desde el flagelo ante condiciones de estrés nutricional (Aggio et al., 2025). En *T. cruzi* se ha reportado la exocitosis de vesículas desde los reservosomas, los MVB y la membrana plasmática, pero no aún desde el flagelo (Camacho et al., 2023). Y, asimismo, se ha demostrado que TvVps32 de *T. vaginales* se encuentra vinculada con la exocitosis de vesículas desde los MVB y la membrana plasmática (Salas et al., 2022). Teniendo en cuenta que ESCRT ha sido históricamente vinculado a la exocitosis, no podría descartarse que TcVps32core focalizada en los flagelos constituya una evidencia de la posible participación de TcVps32 en la exocitosis de *T. cruzi* a través del flagelo. Esto constituye otro interrogante que podría ser tema de estudio. Por último, en lo que respecta a lo estructural de TcVps32, podemos agregar que, ya que los cultivos TcVps32core expresan una proteína activa (proteína Vps32 sin la CTR), es evidente que la CTR es esencial y tiene incidencia en los cambios conformacionales y los cambios de localización subcelular.

Los cultivos TcVps32($\alpha 1$ - $\alpha 5$) expresaron una proteína HA-TcVps32 que consistió en el *core domain* y la hélice $\alpha 5$ CTR. Se ha reportado que la variante truncada de Snf7 ($\alpha 1$ - $\alpha 5$) se ensambla eficientemente en complejos poliméricos asociados con las membranas, por lo

tanto, esa construcción es suficiente para la polimerización y asociación con las mismas (Shim et al., 2007). Es decir, según los autores, esta versión posee estabilidad. Sin embargo, según nuestros resultados, la hélice $\alpha 5$ flexible y desordenada en el extremo podría provocar inestabilidad estructural, lo cual podría explicar la consecuente alteración proliferativa de los cultivos **(Resultados, Análisis estructural, FIGURA 13 y 15)**. De hecho, este cultivo fue el más afectado en su capacidad de crecimiento respecto al cultivo TcVps32core. La remoción de la hélice $\alpha 6$ y el *Linker* parecería generar un cambio de localización de TcVps32, ya que si bien se observó la marca HA-TcVps32 distribuida en el citoplasma en forma de puntos, la misma no se detectó en el flagelo. Esto puede deberse a que la intensidad de fluorescencia es tan mínima que no es captada por el microscopio **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TcVps32 de *T. cruzi*, FIGURA 7)** o, si no es por la limitación de la microscopía, la ausencia de marca en los flagelos podría ser consecuencia de la inestabilidad estructural de esta versión de TcVps32, cuyo extremo es la flexible y desordenada hélice $\alpha 5$ **(Resultados, Análisis de estructura, FIGURA 13 y 15)**. Esta idea de inestabilidad coincide con la alteración del crecimiento de los cultivos, los cuales además mostraron morfología aberrante con prolongaciones compatibles con nanotubos. Ante ciertos eventos estresantes, desde la proximidad del bolsillo flagelar de los parásitos, emergen estas estructuras por las cuales se liberan vesículas extracelulares (EVs) cuyo contenido es diverso y cumplen diversas funciones como la invasión y la comunicación célula- célula (Camacho et al., 2023; Field C Carrington, 2009; Garcia-Silva et al., 2014; Moreira et al., 2019; Szempruch et al., 2016). El hallazgo de estas estructuras constituye evidencia contundente de que los cultivos se encuentran biológicamente afectados. Estas estructuras también fueron reconocidas cuando se procedió al silenciamiento génico de TbVps32 mediante RNAi en *T. brucei*, resultados que serán retomados a la brevedad **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 3)**.

Retomando los resultados de los cultivos, además de la formación de nanotubos, fueron encontrados flagelos cortos, lo cual es coincidente con la ausencia de la marca HA-TcVps32 en los flagelos. En tripanosomas se ha reportado que la formación de flagelos cortos se

produce cuando el IFT se encuentra afectado, ya que normalmente mantiene la integridad de los flagelos (Kohl et al., 2003; Marshall C Rosenbaum, 2001). Esto tiene sentido si se tiene en cuenta que los cultivos HA-TcVps32pRIBOTEX y TcVps32*core*, no presentaron flagelos cortos y presentaron marcas correspondientes a TcVps32 distribuidas en el flagelo. Los flagelos cortos también fueron observados en los cultivos Vps32pTREX (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TcVps32 de *T. cruzi*, FIGURA 5**). Es interesante notar, entonces, que la eliminación del CTR parecería tener un efecto similar al de la sobreexpresión de Vps32 ejercida en este vector (nanotubos y flagelos cortos). Por lo tanto, estos resultados refuerzan la noción de que la CTR de TcVps32 está sujeta a un control regulatorio que influye no solo en los cambios conformacionales sino directamente en su localización subcelular y, en consecuencia, en su función biológica. Paralelamente, se evidencia que la sobreexpresión de TcVps32 induce un marcado nivel de estrés celular en los cultivos, lo que sugiere un desbalance funcional asociado a su desregulación.

Finalmente, los cultivos HA-Δ6TcVps32pRIBOTEX, aquellos que carecen de la hélice α6, fueron los más afectados en su capacidad proliferativa, ya que no pudimos obtener cultivos viables pese a los reiterados intentos. En este caso, la estructura que se genera con este constructo es la más inestable de todas ya que, además del *core*, cuenta con la hélice α5 y el *Linker* CTR, ambas regiones flexibles y desordenadas en el extremo C-terminal (**Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 9 y FIGURA 13**). Particularmente, el *Linker*, al tratarse de una región sin estructura periódica, contribuye a la inestabilidad conformacional de la proteína. Sin embargo, en un estudio estructural del CTR, se ha reportado que la eliminación de aproximadamente 40 aminoácidos de la CTR de Snf7, equivalente a la hélice α6, promueve su unión a membranas y la formación de polímeros (Shim et al., 2007). Si bien en este caso no pudimos obtener un patrón de marcación de TcVps32, ya que no hubo proliferación de los cultivos, puede considerarse que la CTR de TcVps32 es una región sumamente sensible y crítica para la proliferación de los cultivos y su supervivencia. Asimismo, respecto a esta región, los mismos autores concluyeron que la CTR funciona como un regulador negativo, la cual sería responsable del mantenimiento

de la proteína en un estado "cerrado" o autoinhibido en el citoplasma (Shim et al., 2007).

Las distintas versiones TcVps32 expresadas en los distintos cultivos demostraron el papel regulatorio de la CTR y su incidencia en los cambios conformacionales, y, en consecuencia, en su localización subcelular y función. Estudios similares entorno a la CTR se han realizado en levaduras, en los cuales se determinó que la CTR autoinhibe el ensamblaje del complejo ESCRT-III y ayuda a mantener el estado monomérico soluble (inactivo) de Snf7 (Lata et al., 2008a; Shim et al., 2007; Zamborlini et al., 2006). Por lo tanto, las versiones truncadas promovían el ensamblaje del complejo, al igual que la unión a la membrana y la unión de ESCRT-II a Vps20 (Shim et al., 2007; et al., 2006 et al., 2006). Al respecto, si bien restan diversos estudios para verificar estos eventos en *T. cruzi*, los resultados sugieren que obtuvimos una versión activa de la proteína con aparente capacidad de asociación a membranas, como se evidenció en el cultivo TcVps32core ($\Delta 5y6LTcVps32pRIBOTEX$). Pese a que la proliferación de estos cultivos se encontró afectada y al bajo porcentaje de parásitos transgénicos, las imágenes de los cultivos fueron particularmente relevantes acerca el cambio de localización y patrón de la marcación de la proteína. Asimismo, estos resultados aportaron evidencia biológica respecto a un modelo de estructura parcial generada por nosotros y que sería coincidente con lo que podría obtenerse si se cristalizara la proteína (**Resultados, Análisis estructural Vps32, FIGURA 2**). En este contexto, cabe señalar que, si bien el modelo obtenido constituye una propuesta teórica, se encuentra sólidamente respaldado por su elevada homología con la estructura cristalográfica de Snf7, el cual, asimismo, ha servido de templatado.

Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que TcVps32core podría desempeñar funciones semejantes a las de la versión completa HA-TcVps32, dado que representa una variante activa de TbVps32, con capacidad de unirse a las membranas. No obstante, al carecer de la regulación negativa ejercida por la CTR (Shim et al., 2007), es probable que la sobreexpresión de TcVps32core agrave los efectos observados en los cultivos, ya que la proteína permanece en un estado constitutivamente activo, afectando tanto su

localización subcelular como su función. De hecho, esto se refleja en el patrón de marcación observado: en los cultivos, las señales correspondientes a HA-TcVps32_{core} se distribuyen tanto en el citoplasma como en el flagelo, aunque en este último se concentran con mayor intensidad. Así, la CTR podría desempeñar un papel como regulador estructural de TcVps32, modulando sus cambios conformacionales y, en consecuencia, su función, localización celular y capacidad de interacción con las membranas.

Las marcas correspondientes a HA-TcVps32 de todos los cultivos ubicadas en el citoplasma, entre núcleo y kinetoplasto, fueron compatibles con la localización de TbVps32 reportada en *T. brucei* (TrypTag). Por lo tanto, sugerimos que la localización subcelular de TcVps32 de *T. cruzi* se corresponda con los endosomas. En nuestro laboratorio, no fue posible confirmar esta localización con los marcadores específicos (Rab5, Rab11, Rab7, EEA1) y tampoco fue posible evaluar el rol de TcVps32 en el transporte vesicular. Esto no pudo ser llevado a cabo, principalmente, debido a que dichos cultivos fueron perdiendo capacidad proliferativa a lo largo de los días y la marca de la proteína. En este punto, cabe mencionar que, para nuestros estudios, resultó necesario el congelamiento de los cultivos aproximadamente a los diez días post proceso de selección con el antibiótico y observación de los transgénicos mediante microscopía, siendo, muchas veces, un proceso poco exitoso ya que los cultivos no resistían el proceso de descongelamiento o si lo hacían, no presentaban marca de la proteína. Esta situación también desalentó el estudio del ciclo celular, específicamente, de los cultivos HA-TcVps32pRIBOTEX y Vps32pTREX (cultivos que mostraban células biflageladas con configuraciones N-K atípicas que sugerían alguna alteración en la división celular). Asimismo, las limitaciones antes mencionadas nos dejaron interrogantes sobre la localización de TcVps32 en el flagelo y el posible rol en el IFT o la exocitosis, lo cual sería interesante abordar. Respecto al IFT, no sólo sería interesante porque no hay reportes respecto a la participación de TcVps32 en este mecanismo de transporte, sino por la relación del IFT con la fase S del ciclo celular, etapa en la cual se produce la elongación del flagelo y en la que hay un transporte activo de vesículas a la zona equivalente al cuerpo medio del parásito. Esta relación podría ser la causante de la generación de los flagelos cortos observados.

Hasta aquí, concluimos que TcVps32 es esencial en *T. cruzi*, proteína que podría estar implicada en el transporte endocítico e incluso, en algún mecanismo relacionado al IFT. Quedan dudas sobre la implicancia de TcVps32 en el ciclo celular, lo cual sería interesante retomar, ya que el transporte vesicular cumple un rol fundamental en la citoquinesis y debido a que, en nuestro laboratorio, se han caracterizado tres proteínas Aurora quinasa de *T. cruzi*: TcAUK1, TcAUK2 y TcAUK3 (Fassolari & Alonso, 2018), de las cuales TcAUK1 es homóloga funcional de la Aurora quinasa B. La quinasa TcAUK1, presenta un comportamiento canónico del CPC y se encuentra asociada al huso mitótico durante la división nuclear. De hecho, en epimastigotes, se realizaron ensayos de sobreexpresión de TcAUK1 en los cuales se evidenció la alteración del ciclo celular, específicamente el retraso en la transición de la fase G2/M (Fassolari & Alonso, 2018). Por lo tanto, en este tripanosomátido, resultaría de interés investigar si se conserva un mecanismo de regulación que involucre a esta quinasa y a TcVps32. No obstante, dicho mecanismo podría representar una adaptación o una variante del modelo original, dado que, como se ha mencionado, TcVps32 carece del elemento INS en el *Linker* CTR (**Resultados, Búsqueda y detección de genes Vps32, FIGURA 14**).

En relación con la exocitosis de exosomas a través de nanotubos, es probable que se trate de un efecto indirecto derivado del estrés causado por la sobreexpresión en los cultivos. Este fenómeno, así como su posible vínculo con el complejo ESCRT, será retomado más adelante al abordar los resultados del estudio de TbVps32 en *T. brucei*.

Finalmente, es imprescindible, para futuros estudios, considerar otro tipo de herramientas que regulen los niveles de expresión de TcVps32, tales como los vectores inducibles e, incluso, CRISPR/Cas9, ya que es evidente el efecto detrimental de la sobreexpresión constitutiva. La complejidad que significó el estudio de TcVps32 de *T. cruzi* nos alentó a buscar caminos alternativos, los cuales se focalizaron en el tripanosomátido relacionado, *T. brucei*. Los resultados serán discutidos a continuación.

En *T. brucei* se llevaron a cabo dos estrategias antagónicas para el estudio de TbVps32: la sobreexpresión inducida y el silenciamiento génico. En ambos casos, los resultados de las curvas de crecimiento sugirieron que tanto el silenciamiento génico por RNAi como la sobreexpresión inducida causan alteraciones en el crecimiento y la proliferación de los cultivos. Por tanto, los resultados indican que TbVps32 se encuentra bajo una gran regulación tal cual como fue señalado oportunamente en TcVps32 de *T. cruzi*. En suma, a través de nuestros resultados, consideramos que TbVps32 es una proteína esencial para *T. brucei* PCF. En este organismo, además, se han caracterizado otros componentes del complejo ESCRT mediante diversas estrategias experimentales, a partir de las cuales se ha determinado que estas proteínas también cumplen funciones esenciales (Eliaz et al., 2017; Leung et al., 2008; Silverman et al., 2013; Umaer & Bangs, 2020). Por lo tanto, en base a nuestros resultados, proponemos que las funciones del complejo ESCRT en *Trypanosoma brucei* son críticas para la viabilidad y supervivencia del parásito.

El silenciamiento de TbVps32 se confirmó mediante RT-PCR, luego de haber tratado los cultivos RNAiTbVps32 con Tetraciclina por 72 h (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 1**). Sin embargo, ya a las 48 horas de tratamiento con la droga, fue evidente el efecto del silenciamiento (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 2**). De esta manera, a partir de las 48 horas post- tratamiento con Tetraciclina, se observó el progresivo incremento de células con configuraciones N-K atípicas. Entre ellas, la configuración 2N1K fue la que se expresó en mayor proporción en los cultivos tanto a las 48 horas como a las 72 horas (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 3**). Por tanto, la evidencia de células con esta configuración indicaba la alteración (falla total o retroceso) en el ciclo celular. A través de la sincronización de los cultivos RNAiTbVps32, se observó el retraso en la progresión del ciclo celular, con acumulación de células en fases S y G2/M (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA**

5). No obstante, en los cultivos asincrónicos, los perfiles del ciclo celular sólo habían reflejado un retraso sutil en dicha progresión (FIGURA 4 de Resultados de *T. brucei*). Esto sugería que el efecto del silenciamiento de TbVps32 sobre la progresión del ciclo celular estaba influenciado por el estado del cultivo. En consecuencia, en cultivos sincronizados, donde las células transitan las mismas fases celulares, el efecto del silenciamiento resulta más evidente, mientras que en poblaciones asincrónicas la heterogeneidad celular probablemente favorezca la activación de mecanismos compensatorios que atenúan su impacto a nivel poblacional. En este contexto, nuestros resultados mostraron que el silenciamiento de TbVps32 produce un retraso en la progresión del ciclo, la aparición de configuraciones N-K atípicas y fenotipos anormales.

En *T. brucei* PCF, la alteración de la replicación del DNA nuclear bloquea la división nuclear, pero la citoquinesis progresa normalmente (Akiyoshi & Gull, 2013; Vaughan & Gull, 2008). Asimismo, la alteración de la mitosis no previene la citoquinesis. Por tanto, la carencia de un punto de control de la citoquinesis explicaría la presencia del atípico recuento de núcleos observados. Adicionalmente, ante una alteración de la citoquinesis, sería esperable la acumulación de células principalmente con la configuración 2N2K (Hammarton et al., 2007). Sin embargo, en el contexto de nuestros resultados de sincronización, las células presentaron predominio de fenotipos 2N1K. Esta configuración y la detección de zoides, células con configuración 0N1K (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 3B**), han sido descritas en células con el posicionamiento del surco de ingreso afectado (2N2K: 2N1K + 0N1K) (Hammarton et al., 2007).

Adicionalmente, en *T. brucei* PCF, la alteración en la duplicación de los cuerpos basales interfiere con la citoquinesis, lo que conduce a la acumulación de células poliploides. Sin embargo, en los cultivos RNAiTbVps32 se observó que la citoquinesis, aunque defectuosa, logra completarse. Esto sugiere que el retroceso en la progresión de la fase S podría deberse a otro mecanismo. En concordancia con los resultados obtenidos para TcVps32 en *T. cruzi*, es factible que durante la fase S se produzcan alteraciones en la remodelación y

elongación flagelar, sin descartarse además un impacto sobre el transporte intraflagelar (IFT).

En relación con la citoquinesis, diversos estudios en células de mamíferos han destacado el papel esencial del tráfico vesicular en la citoquinesis. En este contexto, se ha evidenciado la presencia de vesículas derivadas del sistema endocítico dentro del puente intercelular (ICB) y se ha demostrado que la interrupción de este transporte afecta negativamente tanto la estabilidad del ICB como la formación adecuada del surco de división (Hammarton et al., 2007). Tal como se ha reportado previamente en plantas, las vesículas y el tráfico vesicular son determinantes para la formación y mantenimiento de una estructura —el fragmoplasto— que crece progresivamente hasta separar físicamente a las dos células hijas. De manera similar, en *C. elegans* y *Drosophila*, tanto la vía secretora como la vía endocítica resultan críticas para la formación del surco de división, así como para la estabilización de los surcos de segmentación en embriones y huevos (Albertson et al., 2005b; Dhonukshe et al., 2006; Frémont & Echard, 2018). En humanos, las vesículas viajan hacia el cuerpo medio donde se genera una plataforma de reclutamiento de proteínas que, incluso, incluyen a la maquinaria ESCRT (D’Avino et al., 2015; Frémont & Echard, 2018). Además, las vesículas aportan componentes esenciales para preservar la integridad del surco, incluyendo proteínas ESCRT involucradas en la reparación de la membrana ya que ésta puede sufrir discontinuidades o daños locales durante la citoquinesis. Se concluye que, para que se lleve a cabo la citoquinesis, se requiere un buen funcionamiento de los mecanismos de transporte y de la biogénesis vesicular.

En síntesis, la participación de ESCRT-III en la citoquinesis es llevada a cabo tanto de forma directa como indirecta. En el mecanismo directo, polímeros de ESCRT-III ensamblados en espiral se introducen en el ICB y median el evento final de escisión, mientras que el mecanismo indirecto implica la participación del transporte vesicular.

El descubrimiento de la participación de ESCRT en la división celular, a través de procesos asociados al transporte vesicular, llevó a proponer que el origen de esta maquinaria es anterior a la aparición de los eucariotas y que su función ancestral estaba directamente

relacionada con la remodelación de membranas durante la citoquinesis (Samson et al., 2008b). En sus inicios, por tanto, las funciones de ESCRT no se asociaron a la formación de vesículas endosómicas, sino que se interpretaron como una estrategia evolutiva primitiva para permitir la separación física de una célula en dos. Posteriormente, con el tiempo, en eucariotas este sistema fue cooptado, diversificado y adaptado, adquiriendo un papel central en procesos más complejos, tales como la compartimentalización celular, el tráfico intracelular y la reparación de membranas.

Por lo tanto, de acuerdo con nuestros resultados y los reportes bibliográficos, TbVps32 de *T. brucei* podría ser esencial tanto para el transporte de vesículas hacia el surco como para la generación de vesículas que contienen componentes clave para la citoquinesis. Además, podría participar en la etapa de abscisión de la citoquinesis, generando la escisión final de las membranas mediante la formación de polímeros. Asimismo, podría participar en la reparación de membranas, dado que las vesículas portadoras de proteínas reguladoras esenciales para este proceso se fusionan con la membrana, favoreciendo su elongación (Frémont & Echard, 2018).

En suma, a partir de nuestros resultados consideramos que la afectación de la proliferación de los cultivos y la alteración del ciclo celular se ven afectados de manera indirecta por el silenciamiento de TbVps32. Según esta idea, el silenciamiento génico de esta proteína altera la dotación de vesículas y, por lo tanto, el transporte de todos los componentes necesarios para la correcta formación del surco de ingreso, cuya integridad es fundamental para la separación de las dos células con contenido normal de DNA.

Dado que en otros organismos se ha demostrado que el tráfico vesicular y el aporte de membranas contribuyen al aumento de la tensión en el ICB, una disminución en la disponibilidad de vesículas en esta región podría impedir el reclutamiento y la polimerización del complejo ESCRT-III (Lafaurie-Janvore et al., 2013). De hecho, el censado de la tensión de la membrana constituye otro punto de control para el reclutamiento de ESCRT-III durante la citoquinesis y, particularmente, de Vps32 en humanos. Si bien son necesarios diversos estudios para confirmar nuestras hipótesis respecto a la relación entre

la citoquinesis y el transporte vesicular en torno a TbVps32, sería interesante también emular el reclutamiento de TbVps32 en este tripanosomátido a través de la modulación de la tensión de la membrana. Tal como se ha reportado para llevar a cabo tal reclutamiento de ESCRT-III, este enfoque podría evaluarse a través de experimentos en los que las células sean sometidas a estrés osmótico, analizando posteriormente si ello conlleva alteraciones en el ciclo celular (Mercier et al., 2020). Cabe destacar que, sería muy interesante evaluar la existencia de un punto de control semejante en tripanosomátidos **(Introducción, 5.5.1 Regulación de la citoquinesis celular, FIGURA 31)**.

En la línea RNAiTbVps32 PCF llevamos a cabo, además, ensayos para evaluar la participación de TbVps32 en el transporte vesicular **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 8)**. Tuvimos nuestras complicaciones con este ensayo respecto a la supervivencia de los parásitos y la marcación del trazador dextrano, el cual serviría para evaluar la endocitosis de fase fluida en este estadio parasitario. Sin embargo, el retraso del transporte endocítico hacia el lisosoma fue detectado a través del trazador FITC-Transferrina (FITC-Tf) **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 8)**. Este resultado fue significativo en sí mismo por el patrón del trazador distribuido en el citoplasma a 28°C, temperatura a la cual tendría que ubicarse en el lisosoma.

Cabe destacar que el trazador FITC-Tf no fue el adecuado para evaluar la endocitosis del estadio PCF de *T. brucei* debido a que, en estas células se encuentra exacerbada la vía endocítica de fase fluida, no así los mecanismos de endocitosis mediada por receptor **(Introducción, Diferencias entre estadios parasitarios de *T. brucei*)**. No obstante, dadas las características de la endocitosis de fase fluida, en el contexto técnico del experimento, se consideró que el trazador igualmente sería internalizado, aunque de forma inespecífica. El resultado, por tanto, fue significativo y útil, ya que brindó información relevante debido a las características químicas del FITC. Al respecto, el trazador FITC es sensible al pH y la fluorescencia se extingue a medida que entra en compartimentos endosomales progresivamente más ácidos. Según las imágenes de nuestros resultados, la carga

fluoresce en el citoplasma a 28°C y se encuentra distribuida en el citoplasma en vez de confluir en un punto (el lisosoma) como se observa en el cultivo control. Es decir, la carga no arriba a los compartimentos degradativos.

Se ha reportado que el silenciamiento de TbVps24 de *T. brucei* BSF no afecta significativamente la captación ni el tráfico endocítico de marcadores como transferrina o *tomato Lectin* (TL) (Umaer & Bangs, 2020). A pesar de que la intensidad de fluorescencia de FITC-TL detectada era mayor en los cultivos en los cuales TbVps24 se encontraba silenciada respecto al control, los autores sugirieron que el silenciamiento de TbVps24 producía la alteración del transporte de la ATPasa vacuolar (bomba de protones) a los compartimentos endolisosomales y la consecuente elevación del pH del lisosoma (Umaer & Bangs, 2020). Por tanto, el silenciamiento de TbVps24 no comprometía el transporte hacia el lisosoma, sino que comprometía la vía biosintética. De hecho, no sólo observaron el retraso del transporte de la ATPasa vacuolar en esta vía, sino también el envío de proteínas recién sintetizadas como p67 y TbCatL desde el Golgi/endosoma hacia el lisosoma.

Para el caso de TbVps4 de *T. brucei*, proteína asociada a MVB, cuando se silenció su expresión se evidenció la reducción de la cinética del tráfico endocítico hacia el lisosoma del trazador FITC sin la alteración del pH lisosomal (Silverman et al., 2013).

Teniendo en cuenta lo observado en otras proteínas ESCRT-III de *T. brucei*, respecto a TbVps32 hubiese sido útil poder cuantificar la intensidad de fluorescencia del trazador FITC por citometría de flujo para poder determinar si la alteración observada en el transporte mediante microscopía se producía por una alteración de la ruta biosintética que afectase el pH intraluminal del lisosoma o por el efecto directo del silenciamiento de TbVps32 sobre el transporte.

Debido a los altercados que tuvimos con la sobrevivencia de los cultivos y la baja marcación registrada del trazador el Alexa 545- Dextrano mediante microscopía de fluorescencia, llevamos a cabo la cuantificación de este trazador mediante citometría de flujo **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 9)**. En este caso, este trazador no es sensible al pH y no podemos atribuir

con certeza que la pérdida de la fluorescencia se debe a que la carga alcanzó el compartimento degradativo a 28°C. En este caso, en los cultivos silenciados RNAiTbVps32 PCF se observa menor intensidad de fluorescencia del Dextrano en relación con su control, lo cual indica la reducción del transporte hacia el lisosoma. Si a este resultado se le adiciona el patrón de la Tf-FITC distribuido en el citoplasma, a través de estos modestos resultados se podría desprender que en los cultivos RNAiTbVps32 PCF se observa la afectación del transporte hacia el lisosoma aun cuando la captación de la carga inicial parece ser normal. Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con lo reportado en TbVps4 de *T. brucei*: la afectación del transporte fue evidenciada como retraso del transporte endocítico hacia el lisosoma y, debido al patrón de marcación de Tf-FITC, patrón muy distinto al reportado en los cultivos silenciados de TbVps24 (Umaer & Bangs, 2020), es probable que no esté relacionado con la afectación del pH intraluminal del lisosoma, sino más bien a que la carga no llega al lisosoma. Por lo tanto, el silenciamiento de TbVps32 podría alterar el transporte hacia el lisosoma, ya sea modificando la cinética del transporte debido a defectos en la biogénesis y maduración de los MVB, o bien de manera indirecta, a través de la afectación de algún componente de la ruta que consecuentemente repercute en el transporte global de la carga/trazador. Consideramos que restan estudios para determinar la causa de la afectación del transporte y, reiteramos la utilidad de cuantificar la señal de Tf -FITC mediante ensayo de pulso y caza, ensayos que también podrían aplicarse a los cultivos HA-TbVps32pLewv100 BSF.

En los cultivos RNAiTbVps32 también se evidenciaron las prolongaciones observadas en los cultivos TcVps32core y TcVps32(α 1- α 5), las cuales en un inicio se pensó que se trataban de flagelos extras (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 3**). Pero, tal como se ha descrito anteriormente, estas prolongaciones consistieron en nanotubos. Estas estructuras han sido reportadas en *T. brucei* bajo condiciones fisiológicas como filamentos dinámicos que se extienden desde la parte posterior de las células (Szempruch et al., 2016). También, estas estructuras fueron observadas *in vitro* al silenciar la expresión génica de proteínas esenciales o por la adición

de complemento activo en el suero de los medios de cultivo (Kauffman & Group, 1969; Sykes et al., 2015). Aunque el rol de estas estructuras aún es un poco incierto en tripanosomas, las mismas aparecen de manera transiente para mediar la comunicación entre parásitos y con la célula huésped, lo cual contribuiría con el desarrollo del parásito, la invasión, la infectividad y la evasión del sistema inmune del huésped (Szempruch et al., 2016).

En *T. brucei* BSF, la exocitosis de exosomas ha sido estudiada poniendo énfasis en TbVps36 (ESCRT-II). Los reportes indican que el silenciamiento de TbVps36 compromete la liberación de exosomas, pero no la liberación de vesículas derivadas de los nanotubos. De esta manera, se distinguieron dos vías de liberación de EVs: vía MVB y los nanotubos (Eliaz et al., 2017). Estos resultados fueron interesantes porque sugieren que la liberación de EVs desde los nanotubos no es mediada por ESCRT, pero da la primera evidencia funcional que los exosomas en *T. brucei* son formados desde los MVBs a través de ESCRT (Eliaz et al., 2017). Dado que el complejo ESCRT participa en el transporte vesicular y en la exocitosis, y considerando que nuestros resultados muestran estructuras similares a los filamentos o nanotubos previamente descritos en células TbVps36, es posible que TbVps32 también desempeñe un rol en la secreción de vesículas extracelulares (EVs) desde los cuerpos multivesiculares (MVBs). Respecto a este compartimento, nuestros resultados de sobreexpresión inducida de HA-TbVps32, ubicaron a esta proteína en asociación con compartimentos endocíticos tempranos y tardíos **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 11 y 13)**, lo cual nos alienta a explorar el posible rol de TbVps32 de *T. brucei* en la exocitosis.

Con el objetivo de evaluar la sobreexpresión inducida de TbVps32 en *T. brucei*, se generaron los cultivos HA-TbVps32pLew100v5. Estos expresaron una proteína TbVps32 de aproximadamente de 34 kDa, lo cual fue coincidente con el hallazgo en TcVps32 y lo reportado en *C. elegans* (Shen et al., 2014) **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 10)**. A través de las curvas de crecimiento, se hicieron evidentes las alteraciones en la proliferación de los cultivos a **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T.***

brucei, FIGURA 12). En estos cultivos, no fueron evidenciadas células morfológicamente defectuosas, por lo cual fue evidente que el silenciamiento génico de TbVps32 causaba efectos más severos en los cultivos. Por lo tanto, los comportamientos observados en ambos tripanosomátidos en relación con Vps32 proporcionan evidencia clara de que TcVps32 y TbVps32 son proteínas esenciales, sensibles a la regulación y a los niveles de expresión.

En los cultivos HA-TbVps32pLew100v5, HA-TbVps32 se visualizó en el citoplasma entre el núcleo y el kinetoplasto, tal como se esperaba para proteínas ESCRT que son reclutadas a las membranas (Leung et al., 2008; Silverman et al., 2013; Umaer & Bangs, 2020). Específicamente, la proteína TbVps32 fue localizada en compartimentos endocíticos tal como se había reportado en la base de datos TrypTag (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 12 y 13**). Al respecto, TbVps32 fue detectada en endosomas tempranos (EE) utilizando el trazador dextrano a 12°C (Allen et al., 2003) y asociada a endolisosomas (fusión del endosoma tardío y lisosoma) mediante DQ- red BSA (**Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 17**). Este patrón de localización coincidió con el reportado por Leung et al. (2008) para TbVps23 y TbVps28; sin embargo, dicho resultado fue cuestionado por Silverman et al. (2013), quienes argumentaron que la localización observada reflejaba una deslocalización inducida por la sobreexpresión ectópica de las proteínas. Silverman et al. (2013) localizaba estas proteínas principalmente asociadas a los endosomas tardíos y en el citoplasma en forma de reservorios disponibles debido al patrón de marcación difuso observado mediante microscopía de fluorescencia. Este último patrón también fue observado en los cultivos HA-TbVps32Lew100v5 de *T. brucei*. La localización de TbVps32 en endosomas tempranos resulta inusual en comparación con lo reportado en otros organismos, en los cuales esta proteína se asocia típicamente con endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares (MVB). Sin embargo, tal como se ha comentado, la vía endocítica es dinámica y los endosomas van madurando a estructuras más complejas a lo largo de la vía. Por lo que, un endosoma temprano madura

a un endosoma tardío, que luego se fusiona con estructuras degradativas como lo son los lisosomas (Langemeyer et al., 2020). Nuestros resultados demuestran el dinamismo de la vía endocítica, de la cual es parte TbVps32. No obstante, sería útil probar otros marcadores de compartimentos endocíticos como TbRab7 (endosomas tardíos), TbRab5A, TbRab5B (endosomas tempranos) e, incluso, TbRab11 (endosomas de reciclaje) para confirmar la localización reportada en nuestros resultados.

El compartimento endocítico terminal de la vía es un lisosoma de tipo vacuolar que posee un marcador ortólogo soluble de la catepsina L, TbCatL. En los cultivos HA- TbVps32pLew100v5, la co-localización de HA-TbVps32 con el anticuerpo anti-TbCatL observada demuestra que la carga llega al lisosoma **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 15)**. Por tanto, los resultados sugieren que TbVps32 participa del transporte de la carga desde el endosoma temprano hacia el lisosoma. Este resultado coincidió con la intensidad de fluorescencia del DQ-red BSA medidos en estos cultivos, trazador que fluoresce al arribar a compartimentos degradativos.

Aunque tuvimos complicaciones con los cultivos RNAiTbVps32 PCF que imposibilitaron la experimentación más exhaustiva para confirmar resultados respecto al transporte endocítico hacia el lisosoma (adicionando marcadores como TbCatL o cuantificando la fluorescencia de Tf- FITC), los ensayos realizados nos permitieron evidenciar la alteración aparente del transporte endocítico hacia el lisosoma. Ya que, según nuestras observaciones, el silenciamiento de TbVps32 afectaba negativamente el transporte endocítico de la carga hacia el lisosoma, nuestra suposición se centró en la posibilidad que la sobreexpresión de TbVps32 lo acelere. Al respecto, se observó mayor intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-TbCatL y DQ-red BSA en los cultivos en los cuales se indujo la sobreexpresión de TbVps32, respecto a los no inducidos **(Resultados, Caracterización funcional de Vps32 en Tripanosomátidos, TbVps32 de *T. brucei*, FIGURA 16 y 17)**. En consecuencia, la sobreexpresión de TbVps32 parecería no afectar el pH de los compartimentos degradativos, ya que el DQ-red BSA fluoresce. Incluso, la sobreexpresión

inducida de HA-TbVps32 parecería aumentar el transporte y la entrega de la carga al lisosoma debido a la gran cantidad de los compartimentos degradativos marcados con el DQ-red BSA. Esto podría coincidir con el incremento de la biogénesis vesicular y/o de la fusión de los compartimientos, lo cual, consecuentemente, podría significar la aceleración de la maduración de los compartimientos endocíticos y la aceleración del transporte. Asimismo, podría ser que la sobreexpresión de TbVps32 aumente el transporte y la función de TbCatL. Tal como se ha mencionado, el silenciamiento de TbVps24 y TbVps4 de *T. brucei* BSF afectó el transporte biosintético de TbCatL al lisosoma (Umaer & Bangs, 2020). De hecho, en el caso del silenciamiento de TbVps24, los defectos se debieron a la alteración de la acidificación del lisosoma, lo cual afectaría la maduración de proteínas lisosomales como TbCatL. En contraposición con ello, ya que al parecer el pH no se afecta ante la sobreexpresión de HA-TbVps32, el transporte de TbCatL a través de la ruta biosintética y su maduración en el lisosoma, no se vería alterado. Sin embargo, teniendo en cuenta los reportes respecto a las proteínas ESCRT, es probable que el transporte de esta proteína sí se viese afectado, en este caso puntual, de manera exacerbado. Para poder comprobar ello, la evaluación de la cinética del transporte mediante un trazador sensible al pH, sería lo indicado para evaluar el transporte hacia el lisosoma. En el caso que el transporte se viese aumentado, la disminución de la intensidad de fluorescencia de la carga en función del tiempo debería ser mayor respecto al control. Estos resultados y los reportados para TbVps24 y TbVps4 deberían ser evaluados en el contexto del silenciamiento de TbVps32, estudios que, como se ha indicado, deberían repetirse. En este caso, también sería necesario evaluar la relación del pH del lisosoma, el transporte y la maduración de TbCatL para evaluar el papel de TbVp32 en la vía endocítica y biosintética.

Por lo tanto, hasta aquí, HA-TbVps32 se localiza en compartimientos endocíticos y presumiblemente, podría estar formando parte del pool libre disponibles en el citoplasma, tal cual se ha reportado en otros miembros ESCRT de *T. brucei* (Silverman et al., 2013; Umaer & Bangs, 2020). Además, TbVps32 de *T. brucei* PCF, parecería cumplir un rol en el transporte vesicular hacia el lisosoma.

En las líneas celulares HA-TbVps32pLewv5 de *T. brucei* PCF, también hubiese sido significativo estudiar el ciclo celular de manera para poder comparar con los resultados obtenidos al silenciar la expresión de la proteína. Al respecto, hubiese sido relevante observar si hay un paralelismo con el transporte vesicular y, paralelamente, evidenciar la localización subcelular de TbVps32 a lo largo del ciclo, algo que no se pudo determinar en cultivos *knockdown*. Sin embargo, en relación con el ciclo celular, es notable que en estos cultivos HA-TbVps32 no se observaron células biflageladas con contenido aberrante de DNA ni nanotubos, lo cual podría deberse al efecto moderado de la estrategia inducible de la expresión. En este caso tampoco la marca HA-TbVps32 parece distribuirse a lo largo del flagelo como ocurre en las líneas celulares sobreexpresantes HA-TcVps32pRIBOTEX de *T. cruzi*. Es lógico que se observen diferencias cuando se comparan organismos distintos (a pesar de ser parte de la misma familia y género) a través de diferentes estrategias. No obstante, a la luz de los resultados en *T. cruzi*, la participación de TbVps32 en el transporte vesicular y las alteraciones en la progresión del ciclo celular de las líneas RNAiTbVps32 de *T. brucei* (que dan como resultado el aumento de células en la fase S y G2/M), sería altamente pertinente profundizar en la posible interrelación de las rutas de tráfico endocítico, el transporte intraflagelar (IFT) y la regulación del ciclo celular, en el contexto funcional de TbVps32.

Oportunamente, al discutir los resultados obtenidos de los cultivos RNAiTbVps32, consideramos que los efectos en el ciclo celular fueron consecuencia de la alteración del transporte vesicular. Si bien en HA-TbVps32pLew100v5 PCF no fueron observadas células biflageladas ni flagelos cortos que justifiquen el estudio del IFT, basándonos en los resultados en *T. cruzi* consideramos que la alteración del transporte podría afectar indirectamente al IFT. Bajo esta premisa, se produciría la alteración de la cinética de elongación normal de los flagelos que se desarrolla durante la fase S, lo cual conllevaría a la alteración de la progresión hacia la fase G2/M, durante la cual, a su vez, la reducción de la dotación de las vesículas provocaría que se afecte la integridad del surco de ingreso y se altere la citoquinesis. Por lo tanto, al igual que lo propuesto para *T. cruzi*, la posible alteración del IFT en *T. brucei* podría representar un efecto secundario derivado de la

disrupción de otro proceso celular: el transporte vesicular. Esto también sería interesante estudiarlo en las líneas celulares HA-TbVps32pLew100v5 BSF para evidenciar la localización de TbVps32 y de otros marcadores.

Nuestros hallazgos respecto a la localización y al rol de TbVps32 en *T. brucei* PCF, concuerdan con la localización endocítica reportada para TbVps23, TbVps24 y TbVps4 y su participación en el tráfico lisosomal, descritos en los tripanosomas BSF. De hecho, estas proteínas ESCRT han sido localizadas asociadas con endosomas tardíos (Umaer & Bangs, 2020). Al respecto, en los cultivos HA-TbVps32pLew100v5 BSF, el patrón de marcación de HA-TbVps32 de *T. brucei* BSF se localizó en el citoplasma, nuevamente rodeando el núcleo y el kinetoplasto, mostrando una distribución compatible con los compartimentos endocíticos, aunque esto último no pudo confirmarse de manera definitiva. Adicionalmente respecto a la localización, la marca HA-TbVps32 se observó distribuida y difusa en el citoplasma, hecho compatible con lo referido al pool libre de TbVps32.

Las curvas de crecimiento mostraron que la sobreexpresión de TbVps32 en *T. brucei* BSF también afectó la proliferación de los cultivos, y dado que la marca HA-TbVps32 co-localizó con el anticuerpo anti-TbCaTL, consideramos la posibilidad que TbVps32 BSF se encuentre vinculada al transporte hacia el lisosoma.

A pesar del avance logrado, varios de los resultados obtenidos en *T. brucei* no pudieron ser replicados ni validados en condiciones experimentales posteriores, lo que limitó la solidez de algunas interpretaciones. Asimismo, no fue posible profundizar en el análisis del transporte vesicular ni explorar en detalle su aparente vínculo con la regulación del ciclo celular. En este sentido, las propuestas experimentales aquí planteadas surgen precisamente de estas limitaciones y del interés no satisfecho por abordar dichas cuestiones en mayor profundidad. Ciertos experimentos propuestos inicialmente no pudieron concretarse debido a restricciones logísticas ajenas al equipo de investigación, las cuales coincidieron con el contexto de emergencia sanitaria internacional y con el agravante que las mismas se desarrollaron durante mi último año de tesis doctoral. Estas limitaciones también frenaron el desarrollo de nuevos experimentos y de aquellos

confirmatorios de resultados ya obtenidos, ya que las líneas celulares HA-TbVps32pLew100v5 de *T. brucei* PCF y BSF establecidas, no resistieron el proceso de descongelamiento al culminar el periodo de confinamiento.

Para el estudio de TcVps32 de *T. cruzi*, al momento de la suspensión de las actividades, contábamos con las construcciones listas de HA-TcVps32pTcINDEX para la transfección de epimastigotes, lo cual nos permitiría estudiar a la proteína mediante una estrategia de sobreexpresión inducible. Lamentablemente, estos experimentos también quedaron en suspenso.

Adicionalmente, se había planificado la expresión de una proteína recombinante Vps32 con el objetivo de generar anticuerpos y, asimismo, estudiar la proteína en relación con su versatilidad estructural: las formas monoméricas y poliméricas de la misma. De esta manera, al momento de interrumpir las actividades, contábamos con la secuencia de TcVps32 de *T. cruzi* subclonadas en los vectores correspondientes: inicialmente en pENTR3C del sistema Gateway, y luego, mediante recombinación, en pDEST17 (con etiqueta 6xHis) y pDEST15 (con etiqueta GST).

Para concluir, consideramos que los resultados hasta aquí expuestos, si bien presentan sus limitaciones en las conclusiones, dejan abiertos ciertos interrogantes que podrían servir de disparadores para estudios futuros no sólo en estos procesos celulares sino en otros mecanismos de transporte como la exocitosis y su relación con la comunicación entre células, la invasión, la colonización del insecto vector y la metaciclologénesis. Asimismo, podría probarse la relación entre Vps32, el recambio de proteínas VSG y los mecanismos de evasión inmune, ya que hay estudios al respecto entorno a otros miembros ESCRT-III de *T. brucei*.

Consideramos que los resultados obtenidos adquieren especial relevancia si se tiene en cuenta que, hasta la fecha, no existen estudios previos sobre esta proteína en ninguno de los dos organismos aquí estudiados. Esta ausencia en la literatura podría deberse, al menos en parte, a las dificultades asociadas con el estudio de una proteína compleja como Vps32.

Su naturaleza estructural altamente dinámica y flexible, junto con su papel en el complejo ESCRT-III —que implica interacciones transitorias y ensamblajes poliméricos de difícil estabilización—representan desafíos significativos para su caracterización bioquímica y funcional, especialmente en estudios *in vitro*. De hecho, tal como se ha mencionado a lo largo del trabajo, uno de los principales obstáculos fue la generación de líneas celulares estables y el mantenimiento adecuado de la densidad de cultivo, lo que limitó la reproducibilidad y continuidad de algunos ensayos. A esto le sumamos a que la infraestructura genética y las herramientas moleculares disponibles en tripanosomas, aunque han mejorado, todavía son más limitadas comparadas con otros sistemas.

En suma, la maquinaria ESCRT y Vps32 se encuentra conservado en ambos tripanosomátidos aquí estudiados. Las regiones NTR de TbVps32 y TcVps32 se encuentran conservadas en su estructura y función. En cuanto a la CTR, su importancia radica en su papel como regulador negativo de la proteína, modulando directamente su función, la localización subcelular y la dinámica de los cambios conformacionales de la proteína. La incidencia de la CTR pudo evidenciarse en los cultivos de los constructos TcVps32*core* y TcVps32(α 1- α 5) de *T. cruzi*.

En *T. cruzi*, restan diversos estudios para evaluar la participación de TcVps32 en el transporte vesicular y, asimismo, y su relación con el ciclo celular. Sin embargo, es evidente que TcVps32 es una proteína esencial para la supervivencia de los parásitos y presenta una localización compatible con la del sistema endocítico tal como en TbVps32 de *T. brucei*.

En relación con TbVps32 de *T. brucei*, nuestros estudios nos permiten sugerir que esta proteína podría estar implicada en el transporte vesicular hacia el lisosoma y constituye un componente esencial de la vía endocítica. Finalmente, el hecho de que en *T. brucei* la proteína TbVps32 sea necesaria para el crecimiento normal de los cultivos, indica que es esencial para la supervivencia de este parásito, lo que implica que esta familia de proteínas también puede ser un objetivo potencial para los fármacos antitripanocidas.

CONCLUSIONES FINALES

- Se identificaron y caracterizaron por primera vez TcVps32 y TbVps32 como ortólogos de Vps32 en tripanosomátidos. Ambas proteínas presentan la organización típica de Snf7/CHMP4: 5 hélices α + región *Linker*.
- Conservan el patrón de cargas, con diferencias sutiles que podrían conferir roles funcionales particulares (Ej. $\alpha 1$ ácida en TcVps32).
- Los motivos ANCHR, MIM-1, MIM-2 y las lisinas de $\alpha 2$ - $\alpha 3$ se encuentran presentes y conservados:
 - ANCHR: presente y conservado, lo que sugiere capacidad de anclaje a membrana, aunque no se puede confirmar el mecanismo con bioinformática.
 - Lisinas positivas en $\alpha 2$ - $\alpha 3$: sugieren conservación del mecanismo de anclaje a membranas descrito para Snf7.
 - MIM-1: posible interacción con otros subcomplejos ESCRT.
 - MIM-2 en el *Linker* CTR: sugiere regulación por la ATPasa Vps4, como ocurre en otros organismos.
- La disposición espacial del MIM-2 rodeado por $\alpha 5$ refuerza la idea de un mecanismo regulatorio dinámico y sinérgico.
- La NTR de TbVps32 y TcVps32 se encuentra conservada, mientras que la CTR muestra un comportamiento dinámico y, de hecho, parecería actuar como regulador negativo (Ej. Construcciones TcVps32).
- La NTR, compuesta por $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$, muestra rigidez estructural y bajo dinamismo (comportamiento ordenado y con baja flexibilidad), excepto ANCHR que es flexible y desordenado.
- La CTR, en contraste, muestra alta flexibilidad y desorden, y dinamismo en su disposición espacial, lo que concuerda con la dificultad de cristalización en la región en estudios previos.
- La conservación estructural de la NTR, el comportamiento de la CTR y la identificación de motivos funcionales indica que TcVps32 y TbVps32 son proteínas dinámicas capaces de alternar conformacionalmente.
- Tanto TbVps32 como TcVps32 podrían desempeñar funciones equivalentes a Snf7/CHMP4A-B:

remodelado de membranas, formación de MVB, transporte endocítico.

- TbVps32 y TcVps32 probablemente no ejerzan un rol regulatorio en la citoquinesis como CHMP4C, ya que carecen del INS. Esto descarta su participación en la citoquinesis regulada por la quinasa Aurora B.
- La sobreexpresión constitutiva de TcVps32 alteró la viabilidad de los cultivos y la morfología celular (células biflageladas, defectos en el DNA y prolongaciones atípicas). Por tanto, TcVps32 es esencial para la supervivencia de *T. cruzi*.
- En los cultivos HA-TcVps32pRIBOTEX, la marca de la proteína se localizó en el citoplasma celular y en el flagelo, entorno al núcleo y el kinetoplasto. El patrón de esta marcación fue granular o puntillada.
- En los cultivos en los cuales se llevó a cabo la sobreexpresión de los constructos con las deleciones en la CTR de TcVps32, se evidenció el cambio de localización de la proteína, con redistribución de TcVps32 hacia citoplasma o hacia el flagelo, según la variante TcVps32. Por tanto, la región CTR influiría directamente en el patrón de localización de TcVps32, en la posibilidad de los cambios conformacionales, y la función de TcVps32.
- Los cultivos que expresaron la versión de TcVps32 con su core domain ($\alpha 1$ – $\alpha 4$), TcVps32_{core} ($\Delta 5y6$ LTcVps32pRIBOTEX), representaron presumiblemente una versión TcVps32 activa constitutivamente, con capacidad de unión a membranas. La proliferación de estos cultivos fue relativa. En estos cultivos, la proteína se focalizó intensamente en el flagelo.
- En las células TcVps32($\alpha 1$ – $\alpha 5$) (HA- $\Delta 6$ LVps32pRIBOTEX), la marca se limitó al citoplasma, sin señal clara en flagelos.
- Los cultivos que expresaron la delección de la hélice $\alpha 6$ (HA- $\Delta 6$ LVps32pRIBOTEX) presentaron problemas en su proliferación, por lo que el efecto fue letal.
- El cambio del patrón de marcación de HA-TbVps32 y de las versiones delecionadas, sugieren un vínculo entre el transporte endocítico e intraflagelar (IFT). Asimismo, la presencia de flagelos cortos en algunos cultivos refuerza la idea de un IFT comprometido. Paralelamente, se presume la posibilidad de un mecanismo compensatorio de localización flagelar frente a defectos endocíticos.
- TbVps32 es esencial para la viabilidad y proliferación de *T. brucei* y se localiza en endosomas.

- TbVps32 participa en la vía endocítica, por tanto, transportaría proteínas ubiquitinadas desde el endosoma hacia el lisosoma.
- El silenciamiento génico de TbVps32 provoca alteraciones severas en el ciclo celular de *T. brucei* PCF, provocando acumulación de células en fase S/G2-M y desarrollo de fenotipos atípicos (2N1K, zoides).
- El silenciamiento génico de TbVps32 PCF provocaría alteraciones en el transporte de proteínas hacia el lisosoma. De esta manera, se produce la acumulación de carga no degradada en el citoplasma.
- TbVps32 participaría en la citoquinesis llevando a cabo la formación y estabilización del surco de división, probablemente mediante aporte vesicular y reparación de membranas.
- La sobreexpresión de TbVps32 parece exacerbar el transporte endocítico hacia el lisosoma debido al aumento de la dotación de compartimentos degradativos.
- En los cultivos TcVps32 se detectaron células con estructuras compatibles con nanotubos, lo cual podría indicar que TcVps32 posee un rol en exocitosis y secreción de EVs como efecto indirecto del silenciamiento o directo. En los cultivos en los cuales se llevó a cabo el silenciamiento génico de TbVps32, también se observaron células con estructuras compatibles con nanotubos. Dado los reportes respecto a TbVps36 y ESCRT en *T. brucei*, el desarrollo de estos nanotubos, presumiblemente secretores de EVs desde los MVB, sugerirían el rol de ESCRT en este proceso.
- Sugerimos que TbVps32 cumple un rol indirecto durante el ciclo celular. La participación directa de TbVps32 se asocia con la biogénesis y el tráfico vesicular endocítico, funciones clásicas del complejo ESCRT.
- En *T. brucei*, TbVps32 lleva a cabo funciones conservadas que han sido adaptadas a tripanosomátidos, integrándose a procesos esenciales para el ciclo celular y la supervivencia del parásito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Absalon, S., Blisnick, T., Kohl, L., Toutirais, G., Doré, G., Julkowska, D., Tavenet, A., & Bastin, P. (2008). Transport and Functional Analysis of Genes Required for Flagellum Formation in Trypanosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 19(3), 929–944. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-08-0749i>
2. Agromayor, M., & Martin-Serrano, J. (2013). Knowing when to cut and run: Mechanisms that control cytokinetic abscission. In *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.006>
3. Akiyoshi, B., & Gull, K. (2013). *Evolutionary cell biology of chromosome segregation: Insight from trypanosomes. figure 1*. <https://doi.org/10.1098/rsob.130023>
4. Albertson, R., Riggs, B., & Sullivan, W. (2005). Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. *Trends in Cell Biology*, 15(2), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.12.008>
5. Albisetti, A. C., Douglas, R. L., & Welch, M. D. (2023). FAZ assembly in bloodstream form Trypanosoma brucei requires kinesin KIN-E. *Molecular Biology of the Cell*, 34(10). <https://doi.org/10.1091/mbc.E23-01-0022>
6. Allen, C. L., Goulding, D., & Field, M. C. (2003). Clathrin-mediated endocytosis is essential in Trypanosoma brucei. *EMBO Journal*, 22(19), 4991–5002. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg481>
7. Andrade, V., Bai, J., Gupta-Rossi, N., Jimenez, A. J., Delevoye, C., Lamaze, C., & Echard, A. (2022). Caveolae promote successful abscission by controlling intercellular bridge tension during cytokinesis. In *Sci. Adv* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm5095>
8. Andrade, V., & Echard, A. (2022). Mechanics and regulation of cytokinetic abscission. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1046617>
9. Archer, S. K., Inchaustegui, D., Queiroz, R., & Clayton, C. (2011). The cell cycle regulated transcriptome of Trypanosoma brucei. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018425>
10. Babst, M. (2011a). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(4), 452–457. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.008>
11. Babst, M. (2011b). *No Title*. 23(4). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.008>
12. Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., & Emr, S. D. (2002). ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell*, 3(2), 271–282. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00220-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00220-4)
13. Babst, M., Sato, T. K., Banta, L. M., & Emr, S. D. (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO Journal*, 16(8), 1820–1831. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1820>
14. Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J., & Emr, S. D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO Journal*, 17(11), 2982–2993. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.11.2982>
15. Bajorek, M., Schubert, H. L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D. M., Stubblefield, W.-M. B., Uter, N. T., Myszk, D. G., Hill, C. P., & Sundquist, W. I. (2009). Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(7), 754–762. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1621>
16. Bankaitis, V. A., Johnson, L. M., & Emr, S. D. (1986). Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole (carboxypeptidase Y/invertase/gene fusion/protein sorting). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 83). <https://doi.org/10.1073/pnas.83.23.9075>
17. Barrias, E. S., de Carvalho, T. M. U., & De Souza, W. (2013). Trypanosoma cruzi: Entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in Immunology*, 4(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00186>
18. 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. *Journal of Proteome Research*, 12(2), 883–897. <https://doi.org/10.1021/pr300947g>

19. Belaunzarán, M. L. (2015). Chagas disease: Globalization and new hope for its cure. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 85–87. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.04.001>
20. Bonfim-Melo, A., Ferreira, E. R., Florentino, P. T. V., & Mortara, R. A. (2018). Amastigote synapse: The tricks of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01341>
21. Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). Review The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. In *Cell* (Vol. 116). [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01079-1)
22. Bonifacino Juan, & Lippincott-Schwartz Jennifer. (2003). *Coat proteins: shaping membrane transport*. <https://doi.org/10.1038/nrm1099>
23. Buchkovich, N. J., Henne, W. M., Tang, S., & Emr, S. D. (2013). Essential N-Terminal insertion motif anchors the ESCRT-III filament during MVB vesicle formation. *Developmental Cell*, 27(2), 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.009>
24. Camacho, A. C., Alfandari, D., Kozela, E., & Regev-Rudzki, N. (2023). Biogenesis of extracellular vesicles in protozoan parasites: The ESCRT complex in the trafficking fast lane? In *PLoS Pathogens* (Vol. 19, Issue 2). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011140>
25. Campsteijn, C., Vietri, M., & Stenmark, H. (2016). Novel ESCRT functions in cell biology: Spiraling out of control? *Current Opinion in Cell Biology*, 41, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.03.008>
26. Capalbo, L., Mela, I., Abad, M. A., Jeyaprakash, A. A., Edwardson, J. M., & D'Avino, P. P. (2016). Coordinated regulation of the ESCRT-III component CHMP4C by the chromosomal passenger complex and centralspindlin during cytokinesis. *Open Biology*, 6(10). <https://doi.org/10.1098/rsob.160248>
27. Capalbo, L., Montembault, E., Takeda, T., Bassi, Z. I., Glover, D. M., & D'Avino, P. P. (2012). The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biology*, 2(5), 120070. <https://doi.org/10.1098/rsob.120070>
28. Carlton, J. G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M., & Martin-Serrano, J. (2012a). ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science*, 336(6078), 220–225. <https://doi.org/10.1126/science.1217180>
29. Carlton, J. G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M., & Martin-Serrano, J. (2012b). ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Science*, 336(6078), 220–225. <https://doi.org/10.1126/science.1217180>
30. Carlton, J. G., & Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: A role for the ESCRT machinery. *Science*, 316(5833), 1908–1912. <https://doi.org/10.1126/science.1143422>
31. Castro, J. A., de Mecca, M. M., & Bartel, L. C. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25(8), 471–479. <https://doi.org/10.1191/0960327106het653oa>
32. Choi, D. S., Kim, D. K., Kim, Y. K., & Gho, Y. S. (2013). Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. In *Proteomics* (Vol. 13, Issues 10–11, pp. 1554–1571). <https://doi.org/10.1002/pmic.201200329>
33. Choudhuri, S. (2014). Additional Bioinformatic Analyses Involving Protein Sequences. *Bioinformatics for Beginners*, 183–207. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410471-6.00008-6>
34. Chowdhury, A. R., Zhao, Z., & Englund, P. T. (2008). Effect of hydroxyurea on procyclic *Trypanosoma brucei*: An unconventional mechanism for achieving synchronous growth. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 425–428. <https://doi.org/10.1128/EC.00369-07>
35. Chu, T., Sun, J., Saksena, S., & Emr, S. D. (2006). New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *Journal of Cell Biology*, 175(5), 815–823. <https://doi.org/10.1083/jcb.200608053>
36. Colombo, M., Moita, C., Van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion

- highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(24), 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
37. Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). *Regulated portals of entry into the cell*. <https://doi.org/10.1038/nature01451>
 38. Coonrod, E. M., & Stevens, T. H. (2010). RETROSPECTIVE The Yeast vps Class E Mutants: The Beginning of the Molecular Genetic Analysis of Multivesicular Body Biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 4057–4060. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
 39. Craik, C. (2008). Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
 40. Cross, G. (2014). *Product Information Sheet for NR-42011 BEI Resources Trypanosoma brucei subsp. brucei, Strain Lister 427 VSG 221 (TetR T7RNAP) (bloodstream form)*. www.beiresources.org
 41. Crowther, & Pearse. (1981). *Assembly and Packing of Clathrin into Coats*. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.790>
 42. D'Avino, P. P., Giansanti, M. G., & Petronczki, M. (2015). Cytokinesis in animal cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015834>
 43. Davis Penny K, Ho Alan, & Dowdy Steven F. (2001). *Biological Methods for Cell- Cycle Synchronization of Mammalian Cells*. <https://doi.org/10.2144/01306rv01>
 44. Del Pozo, M. A., Lolo, F. N., & Echarri, A. (2021). Caveolae: Mechanosensing and mechanotransduction devices linking membrane trafficking to mechanoadaptation. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 68, pp. 113–123). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.10.008>
 45. Demmel, L., Melak, M., Kotisch, H., Fendos, J., Reipert, S., & Warren, G. (2011). Differential selection of golgi proteins by COPII Sec24 isoforms in procyclic Trypanosoma brucei. *Traffic*, 12(11), 1575–1591. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01257.x>
 46. Denny, P. W., Field, M. C., & Smith, D. F. (2001). *GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida*. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02172-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02172-x)
 47. Dhir, V., Goulding, D., & Field, M. C. (2004). TbRAB1 and TbRAB2 mediate trafficking through the early secretory pathway of Trypanosoma brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 137(2), 253–265. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.06.007>
 48. Elia, N., Fabrikant, G., Kozlov, M. M., & Lippincott-Schwartz, J. (2012). Computational model of cytokinetic abscission driven by ESCRT-III polymerization and remodeling. *Biophysical Journal*, 102(10), 2309–2320. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.007>
 49. Eliaz, D., Kannan, S., Shaked, H., Arvatz, G., Tkacz, I. D., Binder, L., Waldman Ben-Asher, H., Okalang, U., Chikne, V., Cohen-Chalamish, S., & Michaeli, S. (2017a). Exosome secretion affects social motility in Trypanosoma brucei. In *PLoS Pathogens* (Vol. 13, Issue 3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006245>
 50. Eliaz, D., Kannan, S., Shaked, H., Arvatz, G., Tkacz, I. D., Binder, L., Waldman Ben-Asher, H., Okalang, U., Chikne, V., Cohen-Chalamish, S., & Michaeli, S. (2017b). Exosome secretion affects social motility in Trypanosoma brucei. *PLoS Pathogens*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006245>
 51. Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., & Overath, P. (2007). Hydrodynamic Flow-Mediated Protein Sorting on the Cell Surface of Trypanosomes. *Cell*, 131(3), 505–515. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.046>
 52. Engstler, M., Thilo, L., Weise, F., Grünfelder, C. G., Schwarz, H., Boshart, M., & Overath, P. (2004). Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in Trypanosoma brucei. *Journal of Cell Science*, 117(7), 1105–1115. <https://doi.org/10.1242/jcs.00938>
 53. Ferrante, A., & Allison, A. C. (1983). Natural agglutinins to African trypanosomes. In *Parasite Immunology* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1983.tb00770.x>
 54. Field, M. C., Allen, C. L., Dhir, V., Goulding, D., Hall, B. S., Morgan, G. W., Veazey, P., & Engstler, M. (2004). New approaches to the microscopic imaging of Trypanosoma brucei. *Microscopy and*

- Microanalysis*, 10(5), 621–636. <https://doi.org/10.1017/S1431927604040942>
55. Field, M. C., & Carrington, M. (2004). Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. In *Traffic* (Vol. 5, Issue 12, pp. 905–913). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00234.x>
 56. Field, M. C., & Carrington, M. (2009). The trypanosome flagellar pocket. *Nature Reviews Microbiology*, 7(11), 775–786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2221>
 57. Field, M. C., Natesan, S. K. A., Gabernet-Castello, C., & Lila Koumandou, V. (2007). Intracellular trafficking in the trypanosomatids. *Traffic*, 8(6), 629–639. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00558.x>
 58. Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., & Walz, T. (2004). *Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy*. <https://doi.org/10.1038/nature03079>
 59. Franco, J. R., Simarro, P. P., Diarra, A., & Jannin, J. G. (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. In *Clinical Epidemiology* (Vol. 6, Issue 1, pp. 257–275). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S39728>
 60. Frémont, S., & Echard, A. (2018). Membrane Traffic in the Late Steps of Cytokinesis. *Current Biology*, 28(8), R458–R470. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.019>
 61. Galanti, N., Dvorak, J., Grenet, J., & McDaniel James. (1994). *Hydroxyurea-induced synchrony of DNA Replication in the Kinetoplastida*. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1252>
 62. Garcia-Silva, M. R., Cura Das Neves, R. F., Cabrera-Cabrera, F., Sanguinetti, J., Medeiros, L. C., Robello, C., Naya, H., Fernandez-Calero, T., Souto-Padron, T., De Souza, W., & Cayota, A. (2014). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitology Research*, 113(1), 285–304. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3655-1>
 63. Garg, S., Sharma, M., Ung, C., Tuli, A., Barral, D. C., Hava, D. L., Veerapen, N., Besra, G. S., Hacohen, N., & Brenner, M. B. (2011). Lysosomal Trafficking, Antigen Presentation, and Microbial Killing Are Controlled by the Arf-like GTPase Arl8b. *Immunity*, 35(2), 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.06.009>
 64. Gervásio, O. L., Phillips, W. D., Cole, L., & Allen, D. G. (2011). Caveolae respond to cell stretch and contribute to stretch-induced signaling. *Journal of Cell Science*, 124(21), 3581–3590. <https://doi.org/10.1242/jcs.084376>
 65. Ghazi-Tabatabai, S., Saksena, S., Short, J. M., Pobbati, A. V., Veprintsev, D. B., Crowther, R. A., Emr, S. D., Egelman, E. H., & Williams, R. L. (2008). Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure (London, England : 1993)*, 16(9), 1345–1356. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.06.010>
 66. Gill, D. J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Emr, S. D., & Williams, R. L. (2007). Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO Journal*, 26(2), 600–612. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601501>
 67. Goliand, I., Adar-Levor, S., Segal, I., Nachmias, D., Dadosh, T., Kozlov, M. M., & Elia, N. (2018). Resolving ESCRT-III Spirals at the Intercellular Bridge of Dividing Cells Using 3D STORM. *Cell Reports*, 24(7), 1756–1764. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.051>
 68. Greca, F. La, & Magez, S. (2011). Vaccination against trypanosomiasis: Can it be done or is the trypanosome truly the ultimate immune destroyer and escape artist? In *Human Vaccines* (Vol. 7, Issue 11, pp. 1225–1233). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.4161/hv.7.11.18203>
 69. Grünfelder, C. G., Engstler, M., Weise, F., Schwarz, H., Stierhof, Y.-D., Boshart, M., & Overath, P. (2002). Accumulation of a GPI-Anchored Protein at the Cell Surface Requires Sorting at Multiple Intracellular Levels. *Traffic*, 3, 547–559. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30805.x>
 70. Grünfelder, C. G., Engstler, M., Weise, F., Schwarz, H., Stierhof, Y.-D., Morgan, G. W., Field, M. C., & Overath, P. (2003). Endocytosis of a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein via Clathrin-coated

- Vesicles, Sorting by Default in Endosomes, and Exocytosis via RAB11-positive Carriers □ V. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 2029–2040. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-10>
71. Guizetti, J., & Gerlich, D. W. (2012). ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 22, Issue 3, pp. 133–140). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.11.007>
 72. Gull, K. (1999). *THE CYTOSKELETON OF TRYPANOSOMATID PARASITES*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.629>
 73. György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., Nagy, G., Falus, A., & Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 68, Issue 16, pp. 2667–2688). <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>
 74. Hall, B. S., Gabernet-Castello, C., Voak, A., Goulding, D., Natesan, S. K., & Field, M. C. (2006). TbVps34, the trypanosome orthologue of Vps34, is required for Golgi complex segregation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), 27600–27612. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602183200>
 75. Hall, B. S., Smith, E., Langer, W., Jacobs, L. A., Goulding, D., & Field, M. C. (2005). Developmental variation in Rab11-dependent trafficking in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 4(5), 971–980. <https://doi.org/10.1128/EC.4.5.971-980.2005>
 76. Halliday, C., de Castro-Neto, A., Alcantara, C. L., Cunha-e-Silva, N. L., Vaughan, S., & Sunter, J. D. (2021). Trypanosomatid Flagellar Pocket from Structure to Function. In *Trends in Parasitology* (Vol. 37, Issue 4, pp. 317–329). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.11.005>
 77. Hammarton, T. C., Monnerat, S., & Mottram, J. C. (2007). Cytokinesis in trypanosomatids. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.10.005>
 78. Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin Proteins Mediate Cellular Penetration, Invasion, and Fusion Events and Define a Novel Type of Membrane Microdomain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 397–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609>
 79. Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT Pathway. In *Developmental Cell* (Vol. 21, Issue 1, pp. 77–91). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>
 80. Henne, W. M., Buchkovich, N. J., Zhao, Y., & Emr, S. D. (2012). The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell*, 151(2), 356–371. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.039>
 81. Hertz-Fowler, C., Ersfeld, K., & Gull, K. (2001). CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. In *Molecular & Biochemical Parasitology* (Vol. 116). [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00296-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00296-1)
 82. Heuser, J. E., & Anderson, R. G. W. (1989). *Hypertonic Media Inhibit Receptor-mediated Endocytosis by Blocking Clathrin-coated Pit Formation*. <https://doi.org/10.1083/jcb.108.2.389>
 83. Hinrichsen, L., Meyerholz, A., Groos, S., & Ungewickell, E. J. (2006). *Bending a membrane: How clathrin affects budding*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600312103
 84. Hirano, S., Kawasaki, M., Ura, H., Kato, R., Raiborg, C., Stenmark, H., & Wakatsuki, S. (2006). Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIP in endosomal protein sorting. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(3), 272–277. <https://doi.org/10.1038/nsmb1051>
 85. Hu, H., Yu, Z., Liu, Y., Wang, T., Wei, Y., & Li, Z. (2014). The Aurora B kinase in *Trypanosoma brucei* undergoes post-translational modifications and is targeted to various subcellular locations through binding to TbCPC1. *Molecular Microbiology*, 91(2), 256–274. <https://doi.org/10.1111/mmi.12458>
 86. Hurley, J. H. (2010). The ESCRT complexes. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 45, Issue 6, pp. 463–487). <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.502516>
 87. Ishida, T., & Kinoshita, K. (2007). PrDOS: Prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1093/nar/gkm363>
 88. Jackson, Y., Alirol, E., Getaz, L., Wolff, H., Combescure, C., & Chappuis, F. (2010). Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication*

- of the Infectious Diseases Society of America, 51(10), e69-75. <https://doi.org/10.1086/656917>
89. Jeffries, T. R., Morgan, G. W., & Field, M. C. (2002). *TbRAB18, a developmentally regulated Golgi GTPase from Trypanosoma brucei*. www.parasitology-online.com
 90. Jones, N. G., Thomas, E. B., Brown, E., Dickens, N. J., Hammarton, T. C., & Mottram, J. C. (2014). Regulators of Trypanosoma brucei Cell Cycle Progression and Differentiation Identified Using a Kinome-Wide RNAi Screen. *PLoS Pathogens*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003886>
 91. Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 5, pp. 313–326). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>
 92. Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., & Xu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*, 7(8), 1511–1522. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085>
 93. Katzmann, D. J., Babst, M., & Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106(2), 145–155. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00434-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00434-2)
 94. Kauffman, S. a, & Group, N. P. (1969). © 1969 Nature Publishing Group. *Group*, 224, 177–178. <https://doi.org/10.1038/224488a0>
 95. Kelly, F. D., Sanchez, M. A., & Landfear, S. M. (2020). Touching the Surface: Diverse Roles for the Flagellar Membrane in Kinetoplastid Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(2). <https://doi.org/10.1128/mmbr.00079-19>
 96. Képè, F., Rambourg, A., Satiat, B., & Jeunemai^tre, J. (2005). Morphodynamics of the Secretory Pathway. In *International Review of Cytology* (Vol. 242). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)42002-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)42002-6)
 97. Khatte, D., Raina, V. B., Dwivedi, D., Sindhwani, A., Bahl, S., & Sharma, M. (2015). The small GTPase Arl8b regulates assembly of the mammalian HOPS complex on lysosomes. *Journal of Cell Science*, 128(9), 1746–1761. <https://doi.org/10.1242/jcs.162651>
 98. Khatte, D., Sindhwani, A., & Sharma, M. (2015). Arf-like GTPase Arl8: Moving from the periphery to the center of lysosomal biology. In *Cellular Logistics* (Vol. 5, Issue 3). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21592799.2015.1086501>
 99. Kieffer, C., Skalicky, J. J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D. M., Kaplan, J., & Sundquist, W. I. (2008). Two Distinct Modes of ESCRT-III Recognition Are Required for VPS4 Functions in Lysosomal Protein Targeting and HIV-1 Budding. *Developmental Cell*, 15(1), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.014>
 100. Kiss, R. S., & Nilsson, T. (2014). Rab proteins implicated in lipid storage and mobilization. *Journal of Biomedical Research*, 28(3), 169–177. <https://doi.org/10.7555/JBR.28.20140029>
 101. Klingbeil, M. M., & Englund, P. T. (2004). *Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401400101>
 102. Kojima, R., Obita, T., Onoue, K., & Mizuguchi, M. (2016). Structural Fine-Tuning of MIT-Interacting Motif 2 (MIM2) and Allosteric Regulation of ESCRT-III by Vps4 in Yeast. *Journal of Molecular Biology*, 428(11), 2392–2404. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.007>
 103. Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morpew, M. K., Shaw, M. K., McIntosh, J. R., & Gull, K. (2009). Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. *Journal of Cell Science*, 122(8), 1081–1090. <https://doi.org/10.1242/jcs.045740>
 104. Lafaurie-Janvire, J., Maiuri, P., Wang, I., Pinot, M., Manneville, J. B., Betz, T., Balland, M., & Piel, M. (2013). ESCRT-III assembly and cytokinetic abscission are induced by tension release in the intercellular bridge. *Science*, 340(6127), 1625–1629. <https://doi.org/10.1126/science.1233866>
 105. Lajoie, P., & Nabi, I. R. (2007). Regulation of raft-dependent endocytosis. In *Journal of Cellular and*

- Molecular Medicine* (Vol. 11, Issue 4, pp. 644–653). <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00083.x>
106. Lakhan, S. E., Sabharanjak, S., & De, A. (2009). Endocytosis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Journal of Biomedical Science*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-16-93>
 107. Langemeyer, L., Borchers, A. C., Herrmann, E., Füllbrunn, N., Han, Y., Perz, A., Auffarth, K., Kümmel, D., & Ungermann, C. (2020). A conserved and regulated mechanism drives endosomal rab transition. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.56090>
 108. Langousis, G., & Hill, K. L. (2014). Motility and more: The flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7), 505–518. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3274>
 109. Langreth, S. G., & Balber, A. E. (1975). Protein Uptake and Digestion in Bloodstream and Culture Forms of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Protozoology*, 22(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1975.tb00943.x>
 110. Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H. G., Svergun, D. I., & Weissenhorn, W. (2008). Structural Basis for Autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *Journal of Molecular Biology*, 378(4), 818–827. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.030>
 111. Leung, K. F., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic*, 9(10), 1698–1716. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00797.x>
 112. Ley, V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V., And, ` , & Andrews', N. W. (1990). *THE EXIT OF TRYPANOSOMA CRUZI FROM THE PHAGOSOME IS INHIBITED BY RAISING THE pH OF ACIDIC COMPARTMENTS*. <https://doi.org/10.1084/jem.171.2.401>
 113. Li, Z. (2012). Regulation of the cell division cycle in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 11(10), 1180–1190. <https://doi.org/10.1128/EC.00145-12>
 114. Link, F., Borges, A. R., Jones, N. G., & Engstler, M. (2021). To the Surface and Back: Exo- and Endocytic Pathways in *Trypanosoma brucei*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.720521>
 115. Lorenzi, H. A., Vazquez, M. P., & Levin, M. J. (2003). Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene*, 310(1–2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00502-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00502-X)
 116. Lupas, A., & Martin, J. (2002). *AAA proteins*. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00388-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00388-3)
 117. Maier, A. G., Webb, H., Ding, M., Bremser, M., Carrington, M., & Clayton, C. (2001). The coatomer of *Trypanosoma brucei*. In *Molecular & Biochemical Parasitology* (Vol. 115). [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00268-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00268-7)
 118. Marcilla, A., Martin-Jaular, L., Trelis, M., de Menezes-Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., Fernandez-Becerra, C., Almeida, I. C., & del Portillo, H. A. (2014). Extracellular vesicles in parasitic diseases. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 3, Issue 1). Co-Action Publishing. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.25040>
 119. Marshall, W. F., & Rosenbaum, J. L. (2001). Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: Implications for flagellar length control. *Journal of Cell Biology*, 155(3), 405–414. <https://doi.org/10.1083/jcb.200106141>
 120. Martinelli, N., Hartlieb, B., Usami, Y., Sabin, C., Dordor, A., Miguët, N., Avilov, S. V., Ribeiro, E. A., Göttinger, H., & Weissenhorn, W. (2012). CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B. *Journal of Molecular Biology*, 419(1–2), 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.02.044>
 121. Martínez-Calvillo, S., López, I., Hernández, R., & Bernardi, A. (1997). pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. In *Gene* (Vol. 199). [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00348-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00348-X)
 122. Martínez-Calvillo, S., López, I., & Hernández, R. (1997). pRIBOTEX expression vector: A pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene*, 199(1–2), 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00348-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00348-X)

123. Marwaha, R., & Sharma, M. (2017). DQ-Red BSA Trafficking Assay in Cultured Cells to Assess Cargo Delivery to Lysosomes. *Bio-Protocol*, 7(19). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2571>
124. Matthews, K. R. (2005). Europe PMC Funders Group The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Cell*, 118(Pt 2), 283–290. <https://doi.org/10.1242/jcs.01649>.The
125. McCullough, J., Row, P. E., Lorenzo, Ó., Doherty, M., Beynon, R., Clague, M. J., & Urbé, S. (2006). Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Current Biology*, 16(2), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.073>
126. McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 12, Issue 8, pp. 517–533). <https://doi.org/10.1038/nrm3151>
127. Mendoza, M., Norden, C., Durrer, K., Rauter, H., Uhlmann, F., & Barral, Y. (2009). A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nature Cell Biology*, 11(4), 477–483. <https://doi.org/10.1038/ncb1855>
128. Miranda, K., Benchimol, M., Docampo, R., & De Souza, W. (2000). *The fine structure of acidocalcisomes in Trypanosoma cruzi*. <https://doi.org/10.1007/s004360050682>
129. Mizuno, E., Kawahata, K., Kato, M., Kitamura, N., & Komada, M. (2003). STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. *Molecular Biology of the Cell*, 14(9), 3675–3689. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-12-0823>
130. Moreira, L. R., Serrano, F. R., & Osuna, A. (2019). Extracellular vesicles of *trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>
131. Morita, E., Colf, L. A., Karren, M. A., Sandrin, V., Rodesch, C. K., & Sundquist, W. I. (2010). Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29), 12889–12894. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005938107>
132. Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.-Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K., & Sundquist, W. I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal*, 26(19), 4215–4227. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601850>
133. Mullins, J. M., & Biesele, J. J. (1977a). Terminal phase of cytokinesis in D 98S cells. *Journal of Cell Biology*, 73(3), 672–684. <https://doi.org/10.1083/jcb.73.3.672>
134. Mullins, J. M., & Biesele, J. J. (1977b). Terminal Phase of Cytokinesis in D-98S cells. In *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* (Vol. 9).
135. Murk, J.-L., Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., & Geuze, H. J. (2002). The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation MVBs contain the molecular machinery for antigen presentation by MHC II. *CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 13, 303–311. [https://doi.org/10.1016/S1084-9521\(02\)00060-5](https://doi.org/10.1016/S1084-9521(02)00060-5)
136. Muzioł, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R. B., Zamborlini, A., Usami, Y., Göttlinger, H., & Weissenhorn, W. (2006). Structural Basis for Budding by the ESCRT-III Factor CHMP3. *Developmental Cell*, 10(6), 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.013>
137. Neves, R. F. C., Fernandes, A. C. S., Meyer-Fernandes, J. R., & Souto-Pradón, T. (2014). *Trypanosoma cruzi*-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. *Parasitology Research*, 113(8), 2961–2972. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3958-x>
138. Nickerson, D. P., West, M., & Odorizzi, G. (2006). Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *Journal of Cell Biology*, 175(5), 715–720. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606113>
139. Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C. V., Biggins, S., & Barral, Y. (2006). The

- NoCut Pathway Links Completion of Cytokinesis to Spindle Midzone Function to Prevent Chromosome Breakage. *Cell*, 125(1), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.045>
140. Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., & Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. In *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 62, Issue 9, pp. 767–776). <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
 141. Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D. J., Perisic, O., Emr, S. D., & Williams, R. L. (2007). Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature*, 449(7163), 735–739. <https://doi.org/10.1038/nature06171>
 142. Odorizzi, G., Babst, M., & Emr, S. D. (1998). Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell*, 95(6), 847–858. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81707-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81707-9)
 143. Oestreich, A. J., Davies, B. A., Payne, J. A., & Katzmann, D. J. (2007). Mvb12 Is a Novel Member of ESCRT-I Involved in Cargo Selection by the Multivesicular Body Pathway □ D. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 646–657. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
 144. Olego-Fernandez, S., Vaughan, S., Shaw, M. K., Gull, K., & Ginger, M. L. (2009). Cell Morphogenesis of *Trypanosoma brucei* Requires the Paralogous, Differentially Expressed Calpain-related Proteins CAP5.5 and CAP5.5V. *Protist*, 160(4), 576–590. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.05.003>
 145. Olmos, Y., & Carlton, J. G. (2016). The ESCRT machinery: New roles at new holes. *Current Opinion in Cell Biology*, 38, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.12.001>
 146. Overath, P., & Engstler, M. (2004). Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Molecular Microbiology*, 53(3), 735–744. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04224.x>
 147. Pacini, M. F., Bulfoni Balbi, C., Dinatale, B., Farré, C., Cacik, P., Gonzalez, F. B., Marcipar, I., & Pérez, A. R. (2024). Intranasal Trans-Sialidase Vaccine Mitigates Acute and Chronic Pathology in a Preclinical Oral Chagas Disease Model. *Vaccines*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/vaccines12101171>
 148. Pal, A., Hall, B. S., Nesbeth, D. N., Field, H. I., & Field, M. C. (2002). Differential endocytic functions of *Trypanosoma brucei* Rab5 isoforms reveal a glycosylphosphatidylinositol-specific endosomal pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(11), 9529–9539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110055200>
 149. Pauwels, K., Lebrun, P., & Tompa, P. (2017). To be disordered or not to be disordered: is that still a question for proteins in the cell? In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 74, Issue 17, pp. 3185–3204). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2561-6>
 150. Peng, J., & Xu, J. (2011). Raptorx: Exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 79(SUPPL. 10), 161–171. <https://doi.org/10.1002/prot.23175>
 151. Pereira, M. G., Nakayasu, E. S., Sant’Anna, C., de Cicco, N. N. T., Atella, G. C., de Souza, W., Almeida, I. C., & Cunha-e-Silva, N. (2011). *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022359>
 152. Petsalaki, E., & Zachos, G. (2019). Building bridges between chromosomes: novel insights into the abscission checkpoint. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 21, pp. 4291–4307). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03224-z>
 153. Petsalaki, E., & Zachos, G. (2021). The abscission checkpoint: A guardian of chromosomal stability. In *Cells* (Vol. 10, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10123350>
 154. Pinazo, M. J., Malchiodi, E., Ioset, J. R., Bivona, A., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2024). Challenges and advancements in the development of vaccines and therapies against Chagas disease. In *The Lancet Microbe*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.100972>
 155. Piper, R. C., & Lehner, P. J. (2011). Endosomal transport via ubiquitination. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 21, Issue 11, pp. 647–655). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.08.007>

156. Ponte-Sucre, A. (2016). An overview of trypanosoma brucei infections: An intense host-parasite interaction. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue DEC). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02126>
157. Porto-Carreiro, I., Rcia Attias, M. Â., Miranda, K., De Souza, W., & Cunha-E-Silva, N. (2000). *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes Endocytosis $\pm$ early endosome $\pm$ reservosome $\pm$ cytostome $\pm$ *Trypanosoma cruzi*. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00112>
158. Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. In *Lancet Infectious Diseases* (Vol. 1, Issue 2, pp. 92–100). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
159. Pust, S., Brech, A., Wegner, C. S., Stenmark, H., & Haglund, K. (2023). Vesicle-mediated transport of ALIX and ESCRT-III to the intercellular bridge during cytokinesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(8). <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04864-y>
160. Qin, H., Diener, D. R., Geimer, S., Cole, D. G., & Rosenbaum, J. L. (2004). Intraflagellar transport (IFT) cargo: IFT transports flagellar precursors to the tip and turnover products to the cell body. *Journal of Cell Biology*, 164(2), 255–266. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308132>
161. Raiborg, C. (2001). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *The EMBO Journal*, 20, 5008–5021. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.5008>
162. Raiborg, C., Wesche, J., Malerød, L., & Stenmark, H. (2006). Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *Journal of Cell Science*, 119(12), 2414–2424. <https://doi.org/10.1242/jcs.02978>
163. Ralston, K. S., & Hill, K. L. (2008). The flagellum of Trypanosoma brucei: New tricks from an old dog. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 38, Issues 8–9, pp. 869–884). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.003>
164. Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., & Evans-Osses, I. (2017). Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of Trypanosoma cruzi in eukaryotic cells. *Cellular Microbiology*, 19(4). <https://doi.org/10.1111/cmi.12672>
165. Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 373–383). <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
166. Redmond, S., Vadivelu, J., & Field, M. C. (2003). RNAi: An automated web-based tool for the selection of RNAi targets in Trypanosoma brucei. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 128(1), 115–118. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00045-8)
167. Ren, X., & Hurley, J. H. (2010). VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO Journal*, 29(6), 1045–1054. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.6>
168. Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122(5), 735–749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043>
169. Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M., & Emr, S. D. (1988). Protein Sorting in Saccharomyces cerevisiae: Isolation of Mutants Defective in the Delivery and Processing of Multiple Vacuolar Hydrolases. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 8, Issue 11). <https://doi.org/10.1128/mcb.8.11.4936-4948.1988>
170. Rodgers, M. J., Albanesi, J. P., & Phillips, M. A. (2007). Phosphatidylinositol 4-kinase III- β is required for Golgi maintenance and cytokinesis in Trypanosoma brucei. *Eukaryotic Cell*, 6(7), 1108–1118. <https://doi.org/10.1128/EC.00107-07>
171. Rothman, J. H., Howald, I., & Stevens, T. H. (1989). Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *The EMBO Journal*, 8(7), 2057–2065. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03614.x>
172. Row, P. E., Prior, I. A., McCullough, J., Clague, M. J., & Urbé, S. (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12618–12624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512615200>

173. Rusten, T. E., & Stenmark, H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *Journal of Cell Science*, 122(13), 2179–2183. <https://doi.org/10.1242/jcs.050021>
174. Saada, E. A., DeMarco, S. F., Shimogawa, M. M., & Hill, K. L. (2015). “With a Little Help from My Friends”—Social Motility in *Trypanosoma brucei*. In *PLoS Pathogens* (Vol. 11, Issue 12). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005272>
175. Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A. E., & Emr, S. D. (2009). Functional Reconstitution of ESCRT-III Assembly and Disassembly. *Cell*, 136(1), 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.013>
176. Salassa, B. N., Cueto, J. A., Gambarte Tudela, J., & Romano, P. S. (2020). Endocytic Rabs Are Recruited to the *Trypanosoma cruzi* Parasitophorous Vacuole and Contribute to the Process of Infection in Non-professional Phagocytic Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.536985>
177. Samson, R. Y., Obita, T., Freund, S. M., Williams, R. L., & Bell, S. D. (2008a). A Role for the ESCRT System in Cell Division in Archaea. *Science*, 322(5908), 1710–1713. <https://doi.org/10.1126/science.1165322>
178. Samson, R. Y., Obita, T., Freund, S. M., Williams, R. L., & Bell, S. D. (2008b). A Role for the ESCRT System in Cell Division in Archaea. *Science*, December, 1710–1713. <https://doi.org/10.1126/science.1165322>
179. Sant’Anna, C., Parussini, F., Lourenço, D., De Souza, W., Cazzulo, J. J., & Cunha-E-Silva, N. L. (2008). All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(6), 1187–1198. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0486-8>
180. Schetman. (1937). *Localized cortical growth as the immediate cause of cell division*. 85, 222–223. <https://doi.org/10.1126/science.85.2200.222>
181. Schiel, J. A., & Prekeris, R. (2013). Membrane dynamics during cytokinesis. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 25, Issue 1, pp. 92–98). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.012>
182. Schiel, J. A., Simon, G. C., Zaharris, C., Weisz, J., Castle, D., Wu, C. C., & Prekeris, R. (2012). FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis. *Nature Cell Biology*, 14(10), 1068–1078. <https://doi.org/10.1038/ncb2577>
183. Schoijet, A. C., Miranda, K., Sternlieb, T., Barrera, N. M., Girard-Dias, W., de Souza, W., & Alonso, G. D. (2018). TbVps15 is required for vesicular transport and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 219, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.11.004>
184. Schöneberg, J., Lee, I. H., Iwasa, J. H., & Hurley, J. H. (2016). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 1, pp. 5–17). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.121>
185. Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Reports*, 16(1), 24–43. <https://doi.org/10.15252/embr.201439363>
186. Sens, P., & Plastino, J. (2015). Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility. In *Journal of Physics Condensed Matter* (Vol. 27, Issue 27). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/27/27/273103>
187. Shaner, N. C., Lambert, G. G., Chammas, A., Ni, Y., Cranfill, P. J., Baird, M. A., Sell, B. R., Allen, J. R., Day, R. N., Israelsson, M., Davidson, M. W., & Wang, J. (2013). A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nature Methods*, 10(5), 407–409. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>
188. Shen, Q. T., Schuh, A. L., Zheng, Y., Quinney, K., Wang, L., Hanna, M., Mitchell, J. C., Otegui, M. S., Ahlquist, P., Cui, Q., & Audhya, A. (2014). Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly. *Journal of Cell Biology*, 206(6), 763–777. <https://doi.org/10.1083/jcb.201403108>
189. Shestakova, A., Hanono, A., Drosner, S., Curtiss, M., Davies, B. A., Katzmann, D. J., & Babst*, M.

- (2010). Assembly of AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 1059–1071. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
190. Shim, S., Kimpler, L. A., & Hanson, P. I. (2007). Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic*, 8(8), 1068–1079. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00584.x>
 191. Shim, S., Merrill, S. A., & Hanson, P. I. (2008). Novel interactions of ESCRT-III with LIP5 and VPS4 and their implications for ESCRT-III disassembly. *Molecular Biology of the Cell*, 19(6), 2661–2672. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1263>
 192. Silverman, J. S., Muratore, K. A., & Bangs, J. D. (2013). Characterization of the late endosomal ESCRT machinery in trypanosoma brucei. *Traffic*, 14(10), 1078–1090. <https://doi.org/10.1111/tra.12094>
 193. Simpson, L. (1986). Kinetoplast DNA in Trypanosomid Flagellates. In *INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY* (Vol. 99). [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61426-6](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61426-6)
 194. Sinclair, A. N., Huynh, C. T., Sladewski, T. E., Zuromski, J. L., Ruiz, A. E., & de Graffenried, C. L. (2021). The Trypanosoma brucei subpellicular microtubule array is organized into functionally discrete subdomains defined by microtubule associated proteins. *PLoS Pathogens*, 17(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009588>
 195. Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R. G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C., & Nassoy, P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, 144(3), 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>
 196. Souza, W. (2009). *Structural organization of Trypanosoma cruzi* (Vol. 104). <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900014>
 197. Souza, W., Carvalho, T. U., & Barrias, E. S. (2017). Ultrastructure of Trypanosoma cruzi and its interaction with host cells. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (pp. 401–427). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00018-6>
 198. Souza, W., Sant’Anna, C., & Cunha-e-Silva, N. L. (2009). Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 44(2), 67–124. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2009.01.001>
 199. Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M. H. A., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., & Gerlich, D. W. (2009). Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization. *Cell*, 136(3), 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.020>
 200. Steverding, D. (2020). The spreading of parasites by human migratory activities. In *Virulence* (Vol. 11, Issue 1, pp. 1177–1191). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1809963>
 201. Steverding, D., Stierhof, Y.-D., Fuchs, H., Tauber, R., & Overath, P. (1995). *Transferrin-binding Protein Complex Is the Receptor for Transferrin Uptake in Trypanosoma brucei*. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.5.1173>
 202. Storino, R. (2023). *CAPÍTULO 24 Trypanosoma cruzi. Enfermedad de Chagas-Mazza*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/149258>
 203. Stuchell-Brereton, M. D., Skalicky, J. J., Kieffer, C., Karren, M. A., Ghaffarian, S., & Sundquist, W. I. (2007). ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*, 449(7163), 740–744. <https://doi.org/10.1038/nature06172>
 204. Sunter, J. D., Benz, C., Andre, J., Whipple, S., McKean, P. G., Gull, K., Ginger, M. L., & Lukeš, J. (2015). Modulation of flagellum attachment zone protein FLAM3 and regulation of the cell shape in Trypanosoma brucei life cycle transitions. *Journal of Cell Science*, 128(15), 3117–3130. <https://doi.org/10.1242/jcs.171645>
 205. Sunter, J. D., & Gull, K. (2016). The Flagellum Attachment Zone: ‘The Cellular Ruler’ of Trypanosome Morphology. In *Trends in Parasitology* (Vol. 32, Issue 4, pp. 309–324). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.010>

206. Szempruch, A. J., Sykes, S. E., Kieft, R., Dennison, L., Becker, A. C., Gartrell, A., Martin, W. J., Nakayasu, E. S., Almeida, I. C., Hajduk, S. L., & Harrington, J. M. (2016). Extracellular Vesicles from *Trypanosoma brucei* Mediate Virulence Factor Transfer and Cause Host Anemia. *Cell*, 164(1–2), 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.051>
207. Tang, S., Henne, W. M., Borbat, P. P., Buchkovich, N. J., Freed, J. H., Mao, Y., Fromme, J. C., & Emr, S. D. (2015). Structural basis for activation, assembly and membrane binding of ESCRT-III Snf7 filaments. *ELife*, 4(DECEMBER2015), 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.12548>
208. Tazeh, N. N., Silverman, J. S., Schwartz, K. J., Sevova, E. S., Sutterwala, S. S., & Bangs, J. D. (2009). Role of AP-1 in developmentally regulated lysosomal trafficking in *trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 8(9), 1352–1361. <https://doi.org/10.1128/EC.00156-09>
209. Teis, D., Saksena, S., & Emr, S. D. (2008). Ordered Assembly of the ESCRT-III Complex on Endosomes Is Required to Sequester Cargo during MVB Formation. *Developmental Cell*, 15(4), 578–589. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.013>
210. Teo, H., Gill, D. J., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Vallis, Y., Emr, S. D., & Williams, R. L. (2006). ESCRT-I Core and ESCRT-II GLUE Domain Structures Reveal Role for GLUE in Linking to ESCRT-I and Membranes. *Cell*, 125(1), 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.047>
211. Thoresen, S. B., Campsteijn, C., Vietri, M., Schink, K. O., Liestøl, K., Andersen, J. S., Raiborg, C., & Stenmark, H. (2014). ANCHR mediates Aurora-B-dependent abscission checkpoint control through retention of VPS4. *Nature Cell Biology*, 16(6), 547–557. <https://doi.org/10.1038/ncb2959>
212. Torró, L. M. de P., Moreira, L. R., & Osuna, A. (2018). Extracellular vesicles in chagas disease: A new passenger for an old disease. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01190>
213. Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, N., & Heine, U. (1981). EXFOLIATION OF MEMBRANE ECTO-ENZYMES IN THE FORM OF MICRO-VESICLES. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 645). [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90512-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5)
214. Trocoli Torrecilhas, A. C., Tonelli, R. R., Pavanelli, W. R., da Silva, J. S., Schumacher, R. I., de Souza, W., e Silva, N. C., de Almeida Abrahamsohn, I., Colli, W., & Manso Alves, M. J. (2009). *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*, 11(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.10.003>
215. Tu, X., Kumar, P., Li, Z., & Wang, C. C. (2006). An aurora kinase homologue is involved in regulating both mitosis and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9677–9687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511504200>
216. Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). *The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited*. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
217. Umaer, K., & Bangs, J. D. (2020). Late ESCRT machinery mediates the recycling and Rescue of Invariant Surface Glycoprotein 65 in *Trypanosoma brucei*. *Cellular Microbiology*, 22(11). <https://doi.org/10.1111/cmi.13244>
218. Umaer, K., Bush, P. J., & Bangs, J. D. (2018). Rab11 mediates selective recycling and endocytic trafficking in *Trypanosoma brucei*. *Traffic*, 19(6), 406–420. <https://doi.org/10.1111/tra.12565>
219. Vaughan, S., & Gull, K. (2008). The structural mechanics of cell division in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Society Transactions*, 36(3), 421–424. <https://doi.org/10.1042/BST0360421>
220. Vazquez, M. (2007). The genetics and genomics of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
221. Vazquez, M. P., & Levin, M. J. (1999). Functional analysis of the intergenic regions of TcP2b gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector k. In *Gene* (Vol. 239). [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00386-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00386-8)
222. Vickerman. (1969). *Localization of Variable Antigens in the Surface Coat of Trypanosoma brucei using*

223. Vild, C. J., & Xu, Z. (2014). Vfa1 binds to the N-terminal Microtubule-interacting and trafficking (MIT) domain of Vps4 and stimulates its ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), 10378–10386. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.532960>
224. Waghbi, M. C., Keramidas, M., Bailly, S., Degrave, W., Mendonça-Lima, L., Soeiro, M. D. N. C., Meirelles, M. D. N. L., Paciornik, S., Araújo-Jorge, T. C., & Feige, J. J. (2005). Uptake of host cell transforming growth factor- β by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: Potential role in parasite cycle completion. *American Journal of Pathology*, 167(4), 993–1003. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61189-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61189-3)
225. Wang, S., Li, W., Liu, S., & Xu, J. (2016). RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W430–W435. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw306>
226. Wang, S., Sun, S., & Xu, J. (2018). Analysis of deep learning methods for blind protein contact prediction in CASP12. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 86, 67–77. <https://doi.org/10.1002/prot.25377>
227. Warren, G. (2013). Transport through the Golgi in *Trypanosoma brucei*. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 140, Issue 3, pp. 235–238). <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1112-y>
228. Watanabe, K., Bianco, C., Strizzi, L., Hamada, S., Mancino, M., Bailly, V., Mo, W., Wen, D., Miatkowski, K., Gonzales, M., Sanicola, M., Seno, M., & Salomon, D. S. (2007). Growth factor induction of crypto-1 shedding by glycosylphosphatidylinositol-phospholipase D and enhancement of endothelial cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31643–31655. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702713200>
229. Wickstead, B., Ersfeld, K., & Gull, K. (2002). *Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of Trypanosoma brucei*. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00238-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00238-4)
230. Wilkowsky, S. E., Isola, E. L. D., Barbieri, M. A., & Stahl, P. D. (2002). Regulation of *trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(3), 516–521. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6474>
231. Williams, R. L., & Urbé, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 355–368. <https://doi.org/10.1038/nrm2162>
232. Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., & Cross, G. A. M. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 99(1), 89–101. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00002-X)
233. Wollert, T., & Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464(7290), 864–869. <https://doi.org/10.1038/nature08849>
234. Woodman, P. G., & Futter, C. E. (2008). Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(4), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.04.001>
235. Wyllie, M. P., & Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. *Pathogens and Disease*, 75(7). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx077>
236. Xu, J., & Wang, S. (2019). Analysis of distance-based protein structure prediction by deep learning in CASP13. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 87(12), 1069–1081. <https://doi.org/10.1002/prot.25810>
237. Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., & Yao, X. (2008). GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7(9), 1598–1606. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700574-MCP200>

238. Yang, B., Stjepanovic, G., Shen, Q., Martin, A., & Hurley, J. H. (2015). Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(6), 492–498. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3015>
239. Yang, D., Rismanchi, N., Renvoisé, B., Lippincott-Schwartz, J., Blackstone, C., & Hurley, J. H. (2008). Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15(12), 1278–1286. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1512>
240. Zerial, M., & McBride, H. (2001). RAB PROTEINS AS MEMBRANE ORGANIZERS. In *NATURE REVIEWS / MOLECULAR CELL BIOLOGY* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1038/35052055>
241. Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Levenson, J. D., Bossy-Wetzel, E., Fan, J. B., Abraham, R. T., & Jiang, W. (2005). Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Molecular Biology of the Cell*, 16(7), 3187–3199. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-02-0167>
242. Zuma, A. A., dos Santos Barrias, E., & de Souza, W. (2020). Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 27(14), 1671–1732. <https://doi.org/10.2174/1381612826999201203213527>