

Universidad Nacional de San Martín (UNSAM)
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIBio)

Caracterización de la familia de antígenos ToIT de *T. cruzi*

Tesis presentada para optar por el título de Doctora en Biología
Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional de San Martín

Autora: Lic. M Maite Lobo
Director: Dr. Carlos Andrés Buscaglia

2024

A mis padres, por la vida y su amor incondicional.

Agradecimientos

A mis padres, Mabel Albarracín y Héctor Lobo, por educarme, cuidarme (y malcriarme).

A Nahuel Costamagna, por la vida compartida, el amor, la paciencia y la sobredosis de café.

A mis *amigas random*: Florencia Burasi, Nayla Camarata, Ivana Ducrey, Katherine Field y Micaela Toniolo, por los consejos y abrazos.

A Mónica Cendali y Miguel Costamagna, por ser excelentes ‘segundos padres’ y por el apoyo cotidiano.

A José Suriano, el *teacher*, por las enseñanzas y el aliento.

A la banda sonora de este manuscrito: Ahyre, Divididos, Duratierra, José Luis Aguirre, Nathy Peluso, Raly Barrionuevo, Residente, Silvana Estrada, Taylor Swift, Triángula, entre otros.

A Carlos Buscaglia, por la oportunidad y el soporte profesional durante todos estos años.

A *La Buscaloneta*: Manuel Abal, Virginia Balouz, Camila Centeno Camean, Lucía Celay, Aldana Cepeda y Guadalupe Romer, por lo compartido a lo largo de tantos días; sin quienes esto no sería posible.

A Nelly, por endulzar mis mañanas y hacerme reír.

A Cecilia Szibener, por la comprensión total.

A *El mejor segundo piso*, por la compañía, el chusmerio, los mates, los churros, etc.

Al IIBio en general, y particularmente a todo aquel que alguna vez me brindó su ayuda.

A quienes colaboraron profesionalmente: Agustina Chidichimo y Liliana Sferco, por las recomendaciones y el cuidado de mis *bichos*; Juan Mucci, por facilitarme el antisuero Anti-TolT-A generado en rata; Fabio Fraga y personal del bioterio, por la inmunización de animales; personal de administración y mantenimiento, por la atención y asistencia diaria; Gabriela Gomez, por el asesoramiento y servicio de microismo circular.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por el financiamiento.

A la Universidad Nacional de San Martín, universidad pública, gratuita y laica, por la posibilidad de realizar un doctorado.

Resumen

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Enfermedad de Chagas, una zoonosis desatendida de gran relevancia médica y socioeconómica en América Latina y un problema emergente para la salud pública global. Actualmente, no existen vacunas ni fármacos apropiados para el tratamiento de esta enfermedad, y los métodos de diagnóstico disponibles presentan serias limitaciones. Además, debe considerarse que este parásito tiene una estructura poblacional compleja, compuesta por múltiples cepas que presentan diferencias genéticas, eco-epidemiológicas y biológicas (susceptibilidad a drogas, composición antigénica, tropismo tisular, virulencia en modelos animales de infección, etc.) que pueden afectar su dinámica de transmisión, la eficacia del tratamiento y la evolución clínica de la enfermedad.

TolT es un antígeno de *T. cruzi* de estructura aparentemente simple (en su descripción original de 1990 se mostró que estaba codificado por tres genes casi idénticos dispuestos en tándem) y con expresión restringida al flagelo del estadio tripomastigote infectivo. A lo largo de los años, diversos estudios revelaron su potencialidad para el desarrollo de aplicaciones serodiagnósticas y terapéuticas. La recurrente identificación de secuencias TolT en bases de datos ‘ómicas’ del parásito sugiere que este antígeno presenta una gran variabilidad intra- e inter-cepas y que cumple roles relevantes en la biología del parásito. En vista de la urgente necesidad de biomarcadores, y teniendo en consideración la abundancia de herramientas moleculares y celulares generadas para el análisis de *T. cruzi* en los últimos años, planteamos como objetivo general de esta Tesis la re-evaluación antigénica y funcional de TolT.

Primeramente, se exploró su diversidad genética, utilizando herramientas bioinformáticas y los genomas disponibles de *T. cruzi*. Se generó una base de datos curada de aproximadamente 190 secuencias TolT, incluyendo genes y pseudogenes; que se clasificaron en tres grupos principales (A, B y C). Estos grupos muestran una distribución diferencial entre cepas de *T. cruzi*, así como distintas propiedades estructurales, bioquímicas y antigénicas. Con cierta variabilidad, también se identificaron secuencias TolT en otros tripanosomátidos relacionados. A partir de estos datos y de exhaustivos mapeos genómicos, se logró capturar de manera fehaciente la amplitud y complejidad de la familia multigénica TolT, planteándose una hipótesis sobre su evolución.

Para la caracterización de las proteínas TolT se utilizaron enfoques bioinformáticos y bioquímicos. En términos generales, las TolT cuentan con un péptido señal clivable, un motivo de anclaje a la capa externa de la membrana lipídica mediante la adición de un grupo

glicosilfosfatidilinositol y múltiples sitios potenciales de N-glicosilación, todas firmas de localización en superficie y/o secreción en tripanosomátidos. También se describe la aplicación de un sistema genético basado en la expresión homóloga en *T. cruzi* para ahondar en la caracterización molecular de TolT.

Para la caracterización estructural se utilizaron herramientas de modelado molecular y ensayos de difracción circular. Para todos los grupos de TolT se propone una configuración tridimensional común (que a su vez es similar a la descrita para las proteínas TolA bacterianas), ensamblada a partir de hélices α que se disponen formando una 'cabeza' N-terminal y un 'tallo' C-terminal, que facilita el espaciado respecto a la membrana plasmática del parásito. Mediante la generación de proteínas recombinantes con mutaciones puntuales, se exploró también el rol de residuos cisteínas absolutamente conservados en la estabilización de la 'cabeza' N-terminal de las TolT.

Se analizó la expresión, tanto a nivel de ARNm como de proteína, y la localización subcelular de las TolT en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. En tripomastigotes, los tres tipos de moléculas se localizan en la superficie del flagelo, en la zona de contacto entre esta estructura y el cuerpo del parásito. TolT-A y -B presentan un patrón punteado, aunque con mínima co-localización entre ellas; mientras que TolT-C presenta una distribución continua. También se demostró la expresión de las TolT en amastigotes, donde muestran una localización diferencial, aunque invariablemente intracelular.

En la última sección, se describe de manera exhaustiva el perfil antigénico de las proteínas TolT, con la idea de optimizar su uso como reactivo serodiagnóstico. Utilizando ensayos inmunoquímicos basados en microarreglos de péptidos y/o proteínas recombinantes, se definieron sus epítomos B lineales y los tipos de reconocimiento por anticuerpos presentes en sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas provenientes de distintas zonas endémicas.

Finalmente, se presenta una discusión global de los resultados obtenidos, sus limitaciones y potencialidades, y su articulación en el marco del conocimiento actual sobre la biología de *T. cruzi* y el diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Si bien aún quedan desafíos por delante, los hallazgos presentados en esta Tesis contribuyen al desarrollo e implementación de estrategias conducentes a un mejor control de esta enfermedad de gran impacto regional.

Palabras clave:

Trypanosoma cruzi, Enfermedad de Chagas, TolT, antígeno, diagnóstico serológico.

Abstract

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease, a neglected zoonosis of significant medical and socioeconomic relevance in Latin America and an emerging problem for global public health. Currently, there are no vaccines or appropriate drugs for treating this disease, and the available diagnostic methods display serious limitations. Additionally, it should be considered that this parasite has a complex population structure, made up of multiple strains that exhibit genetic, eco-epidemiological, and biological differences (drug susceptibility, antigenic composition, tissue tropism, virulence in animal infection models, etc.) that can affect its transmission dynamics, treatment efficacy, and clinical evolution of the disease.

ToIT is a *T. cruzi* antigen with an apparently simple structure (in its original description from 1990, it was shown to be encoded by three nearly identical genes arranged in tandem) and expression restricted to the flagellum of the infective trypomastigote stage. Over the years, various studies have revealed its potential for the development of serodiagnostic and therapeutic applications. The recurrent identification of ToIT sequences in parasite's 'omics' databases suggested that this antigen exhibits significant intra- and inter-strain variability and plays relevant roles in the parasite's biology. Given the urgent need for biomarkers, and considering the abundance of molecular and cellular tools generated for the analysis of *T. cruzi* in recent years, the general objective of this PhD Thesis is the antigenic and functional re-evaluation of ToIT.

Firstly, its genetic diversity was explored using bioinformatics tools and the available *T. cruzi* genomes. A curated database of approximately 190 ToIT sequences, including genes and pseudogenes, was generated and classified into three main groups (A, B, and C). These groups show differential distribution among *T. cruzi* strains, as well as different structural, biochemical, and antigenic properties. With some variability, ToIT sequences were also identified in other related trypanosomatids. Based on these data and exhaustive genomic mappings, the breadth and complexity of the ToIT multigene family were accurately captured, and an hypothesis about its evolution was proposed.

For the characterization of ToIT proteins, bioinformatic and biochemical approaches were used. In general, ToIT proteins feature a cleavable signal peptide, an anchor motif to the outer layer of the lipid membrane through the addition of a glycosylphosphatidylinositol group, and multiple potential N-glycosylation sites, all signatures of surface localization and/or secretion in trypanosomatids. The application of a genetic system based on

homologous expression in *T. cruzi* for in-deph molecular characterization of TolT is also described.

For structural characterization, molecular modeling tools and circular dichroism assays were used. A common three-dimensional configuration is proposed for all TolT groups (which is similar to that described for bacterial TolA proteins), assembled from α -helices forming an N-terminal 'head' and a C-terminal 'stem', facilitating the spacing from the parasite's plasma membrane. By generating recombinant proteins with point mutations, the role of absolutely conserved cysteine residues in stabilizing the N-terminal 'head' of TolT was also explored.

The expression, at both mRNA and protein levels, and the subcellular localization of TolT in the different stages of the *T. cruzi* life cycle were analyzed. In trypomastigotes, all three types of molecules are located on the flagellum's surface, at the contact zone between this structure and the parasite's body. TolT-A and -B show a dotted pattern, although with minimal co-localization between them, while TolT-C displays a continuous distribution. The expression of TolT in amastigotes was also demonstrated, where they exhibit differential but invariably intracellular localization.

In the last section, the antigenic profile of TolT proteins is exhaustively described, aiming to optimize their use as serodiagnostic reagents. Using immunochemical assays based on peptide microarrays and/or recombinant proteins, their linear B epitopes and antibody recognition types present in sera from Chagas disease patients from different endemic areas were defined.

Finally, a comprehensive discussion of the obtained results, their limitations and potential, and their integration within the current knowledge of *T. cruzi* biology and Chagas disease diagnosis and treatment is presented. Although challenges remain ahead, the findings presented in this PhD Thesis contribute to the development and implementation of strategies leading to better control of this disease with significant regional impact.

Key words:

Trypanosoma cruzi, Chagas Disease, TolT, antigen, serological diagnosis.

Publicaciones

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

Lobo MM, Balouz V, Melli L, Carlevaro G, Cortina ME, Cámara M, et al. Molecular and antigenic characterization of *Trypanosoma cruzi* TolT proteins. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13: e0007245.

Balouz V, Mesias AC, Camean CC, Ducrey I, Lobo MM, Durante IM, et al. Homologous Expression of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Glycoproteins in *Trypanosoma cruzi*. Methods Mol Biol. 2019;1955: 119–134.

Otros artículos relacionados con la Enfermedad de Chagas y la biología de *Trypanosoma cruzi* publicados durante mi Tesis Doctoral:

Cámara M, Balouz V, Centeno Cameán C, Cori CR, Kashiwagi GA, Gil SA, Macchiaverna NP, Cardinal MV, Guaimas F, Lobo MM, de Lederkremer RM, Gallo-Rodriguez C, Buscaglia CA. *Trypanosoma cruzi* surface mucins are involved in the attachment to the *Triatoma infestans* rectal ampoule. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13: e0007418.

Abreviaturas

aa: Aminoácido.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNg: ADN genómico.

ADNk: ADN del kinetoplasto.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

BCY84: *T. cruzi* clon Dm28c 2017.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

C3747: *T. cruzi* clon TCC.

C4B63: *T. cruzi* clon Dm28c 2018.

CBB: *Coomassie Brilliant Blue*.

DE: Desvío estándar.

DQ04: *T. grayi* ANR 4.

DTT: Ditiotreitól.

DTU (*Discrete Typing Unit*): Unidad discreta de tipificación.

ECC02: *T. cruzi* clon Berenice.

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*): Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

fw: *Forward*.

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

GPI: Glicosilfosfatidilinositol.

GST: Glutati6n-S-Transferasa de *Schistosoma japonicum*.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

IgG: Inmunoglobulina G.

LSM04: *T. melophagium* StKilda.

Mr: Masa molecular.

nt: Nucle6tido.

ON (*overnight*): Toda la noche.

PBS (*phosphate buffer saline*): *Buffer* fosfato salino.

PBST: PBS con 0.05% (v/v) Tween 20.

PCR (*polymerase chain reaction*):

Reacci6n en cadena de la polimerasa.

rv: *Reverse*.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

SOEing PCR: *Splicing by overlap-extension PCR*.

SP (*signal peptide*): Péptido se6al.

Tc_MARK: *T. cruzi* marinkellei B7.

Tc_SYL: *T. cruzi* clon Sylvio X10/1.

TcBol: *T. cruzi* clon BOL-FC10A.

TcBrA4: *T. cruzi* clon Brazil A4.

TcCLB: *T. cruzi* clon CL Brener.

TCDM: *T. cruzi* clon Dm28c 2014.

TcJoseJulio: *T. cruzi* clon Jose Julio.

TcMT3663: *T. cruzi* clon MT3663.

TcRA: *T. cruzi* clon RA.

TcYC6: *T. cruzi* clon YC6.

TM35: *T. theileri* isolate Edinburgh.

TRSC58: *T. rangeli* clon SC58.

WB: *Western blot*.

WT: *Wild type*.

Índice de secciones

Introducción.....	1
Clase kinetoplastida y tripanosomátidos.....	1
<i>T. cruzi</i> y Enfermedad de Chagas.....	2
Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	4
Diversidad genética de <i>T. cruzi</i>	5
Aspectos genómicos de <i>T. cruzi</i>	7
Familias multigénicas de <i>T. cruzi</i>	8
El flagelo de <i>T. cruzi</i>	9
TolT (TolA-like protein from <i>T. cruzi</i>).....	11
Objetivos.....	14
Resultados.....	15
1. Identificación y caracterización de genes TolT en <i>T. cruzi</i>	15
TolT constituye una familia génica compleja de tripanosomátidos.....	15
Evolución de los genes TolT en tripanosomátidos.....	22
2. Caracterización de proteínas TolT en <i>T. cruzi</i>	28
Las proteínas TolT presentan firmas de localización en superficie y/o secreción.....	28
TolT tiene homología estructural con las TolA bacterianas.....	30
Las TolT están formadas por estructuras secundarias de tipo hélices α	33
Las proteínas TolT-B forman agregados <i>in vivo</i>	34
3. Expresión de TolT durante el ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	39
Los niveles de ARNm de TolT son mayores en estadios de mamífero de <i>T. cruzi</i>	39
La expresión de proteínas TolT se restringe a los estadios de mamífero de <i>T. cruzi</i> ...	40
TolT se localiza en el flagelo de tripomastigotes y zonas discretas de amastigotes...	42
4. Caracterización bioquímica de TolT.....	46
Las proteínas TolT se encuentran asociadas, en su C-terminal, a un anclaje GPI.....	46
TolT presenta diferentes patrones de glicosilación entre cepas de <i>T. cruzi</i>	47
Sobre-expresión homóloga de TolT en <i>T. cruzi</i>	48
5. Identificación, mapeo y validación de epítomos en TolT.....	54
El reconocimiento por anticuerpos se dirige al C-terminal maduro de TolT.....	54
Discusión y conclusiones.....	62
Materiales y métodos.....	69
Análisis bioinformático.....	69
Materiales y técnicas de laboratorio.....	69
Bacterias.....	69
Células.....	70
Parásitos.....	70
Técnicas de biología molecular y ADN recombinante.....	71
Expresión y análisis de proteínas.....	74
Sueros de infección, inmunización de animales y obtención de antisueros.....	75
Inmunoensayos.....	76

Técnicas bioquímicas.....	78
Técnicas biofísicas.....	80
Anexos.....	81
Antisueros.....	81
Oligonucleótidos.....	81
Plásmidos.....	83
Construcciones.....	85
Figuras suplementarias.....	93
Bibliografía.....	98

Introducción

Clase kinetoplastida y tripanosomátidos

La clase *Kinetoplastida* (*Eukaryota*, *Excavata*, *Euglenozoa*) comprende a un grupo diverso de protozoos, organismos eucariotas unicelulares, caracterizados por la presencia de una organela única denominada kinetoplasto, la cual contiene múltiples copias de ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial dispuestas en una compleja red [1]. Los kinetoplastidos exhiben una amplia distribución y abarcan tanto organismos de vida libre como parásitos de plantas y animales, incluido el ser humano. La clase *Kinetoplastida* se divide en varios órdenes, entre los que se incluye a *Trypanosomatida*, compuesto por organismos uniflagelados que exhiben una amplia variedad de morfologías y un kinetoplasto relativamente pequeño (comparado con otros *Kinetoplastida* como, por ejemplo, *Trypanoplasma* spp. o *Perkinsela* spp. [1]). La mayoría de los tripanosomátidos son parásitos obligados, algunos de gran relevancia médica y/o veterinaria [2]. Particularmente, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), *Leishmania* spp. y *Trypanosoma brucei* spp. son patógenos de superlativa importancia sanitaria como agentes etiológicos de la Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana), los distintos tipos de Leishmaniasis y la Enfermedad del sueño o nagana (Tripanosomiasis Africana), respectivamente. Estas se encuentran categorizadas dentro de las enfermedades tropicales desatendidas (*Neglected Tropical Diseases*), afectando a millones de personas (y animales) en el mundo y con un gran impacto social y económico en los países endémicos [3].

Además de la intrincada arquitectura del ADN mitocondrial (ADNk) que los define, los tripanosomátidos poseen otras características biológicas relevantes y distintivas en cuanto a por ejemplo, su estructura genómica, transcripción génica, metabolismo y organización celular. Entre ellas, cabe mencionar: i) la alta plasticidad genómica, que determina incluso la tolerancia a diferentes eventos de aneuploidía parcial o total en sus cromosomas [4]; ii) la compartimentalización del genoma nuclear en subdominios ‘core’ (conservados y sinténicos entre tripanosomátidos) y ‘disruptivos’, que segregan de los anteriores por posición (tienden a agregar hacia los sub-telómeros de los cromosomas, al menos en *T. brucei* y *Leishmania*), contenido de GC, composición génica y modificaciones epigenéticas [4–6]; iii) la edición de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) mitocondriales, en forma de inserción y/o delección de uridinas [7]; iv) la transcripción policistrónica de los genes nucleares, que está a su vez acoplada a un mecanismo de *trans-splicing* por adición de una secuencia (llamada mini-exón) absolutamente conservada para generar los ARNm maduros [8–11]; v) la casi total ausencia

de intrones y promotores para ARN polimerasa II; vi) la presencia de organelas especializadas, denominadas glicosomas, donde se compartimentaliza y, por lo tanto, se maximiza la eficiencia de la glicólisis [7] o vii) la presencia de un ‘glicocalix’, una densa capa de glicoconjugados en su cubierta, con implicancias en la evasión de la respuesta inmune y en la patogenicidad [12]. Todas estas particularidades (más otras que no han sido mencionadas aquí), y el hecho de constituir una rama ancestral en el linaje de los eucariotas, convierte a los tripanosomátidos en organismos sumamente interesantes desde el punto de vista biológico y evolutivo [1].

***T. cruzi* y Enfermedad de Chagas**

La Tripanosomiasis Americana, comúnmente llamada Enfermedad de Chagas, es causada por la infección con *T. cruzi* [13]. En zonas endémicas, este parásito se transmite principalmente a través de la picadura de la ‘vinchuca’, un insecto hematófago de amplia distribución en América Latina; aunque también puede ocurrir por consumo de alimentos o bebidas contaminadas con el parásito, de madre a hijo durante el embarazo o el parto, así como a través de transfusiones de sangre o trasplantes de órganos a partir de donantes infectados.

Una vez que el parásito entra en el organismo, tras un período de incubación de 5 a 40 días, entre el 10 y el 30% de los individuos infectados manifiestan los síntomas de la etapa aguda de la enfermedad. El más frecuente es la aparición de un edema en el sitio de infección denominado ‘Chagoma’; o bien, cuando la entrada es por la conjuntiva ocular, de un edema palpebral unilateral característico denominado ‘Signo de Romana’ (Fig. II) [14,15]. Estas manifestaciones facilitan el diagnóstico de la enfermedad, aunque es común que la misma se presente de manera subclínica o asociada con síntomas inespecíficos como dolor de cabeza, fiebre, dolor estomacal, anorexia, entre otros. La tasa de mortalidad de la Enfermedad de Chagas aguda es del 5 al 10%, siendo las víctimas más frecuentes los niños que desarrollan miocarditis o meningoencefalitis [14,15]. La fase aguda, caracterizada por altos niveles de parasitemia, concluye cuando se alcanza un equilibrio patógeno-hospedador en el cual el número de parásitos circulantes se reduce drásticamente y se produce la ‘seroconversión positiva’ o ‘seropositivización’: un aumento significativo de la reactividad humoral contra distintos antígenos de *T. cruzi*.

En ausencia de tratamiento con las drogas disponibles (Nifurtimox y Benznidazol), los pacientes evolucionan hacia la fase crónica de la enfermedad. La mayoría de ellos permanecen asintomáticos durante sus vidas, aunque representan una potencial fuente de transmisión y pueden sufrir una reactivación de la infección si son inmunosuprimidos [16].

Más importante aún, aproximadamente el 30% de las personas infectadas con *T. cruzi* desarrollan, al cabo de varios años, manifestaciones clínicas características de la fase crónica de la enfermedad, que incluyen, entre las patologías más comunes, las cardiomiopatías y desórdenes gastrointestinales como megaesófago y megacolon (Fig. I1) [13].

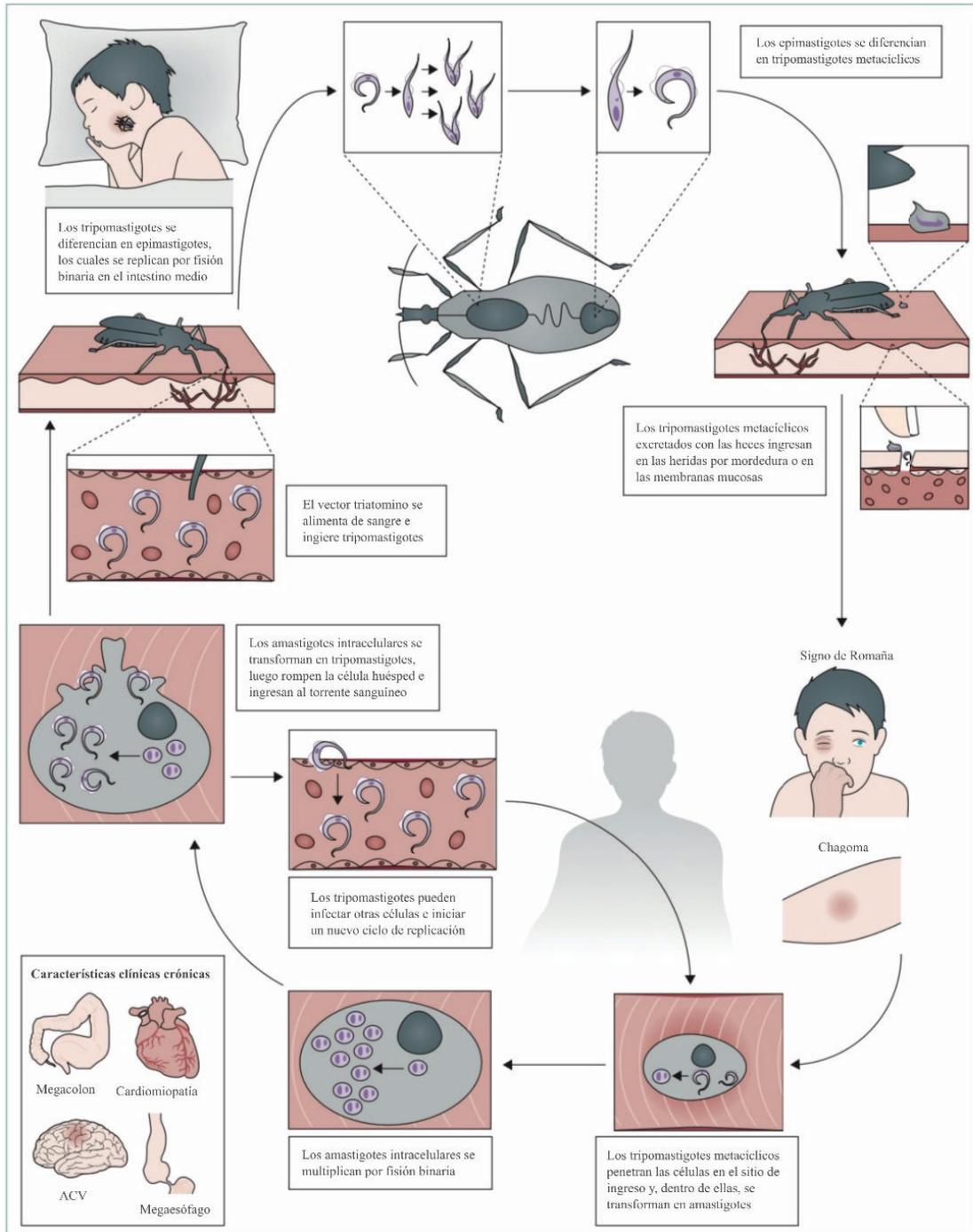


Figura I1: Ciclo de vida de *T. cruzi*. Adaptado de [17].

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la Enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América [13]. En los últimos años, además, y debido a fenómenos migratorios humanos, se ha registrado un aumento en el número de casos en países no endémicos (donde no se encuentran los insectos transmisores), convirtiéndose en un problema emergente de la salud pública global [18]. La detección y el seguimiento de los pacientes con Enfermedad de Chagas representan un gran desafío debido a la variedad de presentaciones clínicas, la prolongada fase asintomática en la mayoría de los casos crónicos y, sobre todo, a las deficiencias estructurales de los sistemas de salud en regiones endémicas. La ausencia de marcadores específicos y sensibles limita la capacidad para realizar un diagnóstico preciso en las fases tempranas, monitorizar adecuadamente la respuesta al tratamiento, predecir la evolución hacia manifestaciones crónicas severas y desarrollar nuevas drogas y/o terapias contra este patógeno.

Ciclo de vida de *T. cruzi*

T. cruzi posee un ciclo de vida digenético, que alterna entre un insecto vector (Subfamilia: *Triatominae*, Familia: *Reduviidae*, Orden: *Hemiptera*) y un mamífero hospedador (doméstico o salvaje, incluyendo al hombre), y consta de varias formas de desarrollo o estadios, que maximizan su adaptación y sobrevivencia en los distintos nichos en los que se desarrollan. Los tripomastigotes sanguíneos son las formas circulantes, infectivas y no replicativas, presentes en el hospedador mamífero y consumidas por el insecto hematófago durante la ingesta de sangre (Fig. 11). En el tracto digestivo anterior de la vinchuca, los tripomastigotes sanguíneos se diferencian extracelularmente en epimastigotes, forma replicativa no infectiva. Los epimastigotes se adhieren a la pared de la ampolla rectal, donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos (bioquímica y morfológicamente distintos a los tripomastigotes sanguíneos), forma no replicativa que transmite la infección al hospedador mamífero al depositarse junto con la excreta en la herida resultante de la picadura o en las mucosas (Fig. 11). Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de infectar una amplia variedad de células nucleadas en el hospedador mamífero [19], donde se diferencian en amastigotes, forma replicativa que tras varias rondas de división binaria se transforman nuevamente en tripomastigotes sanguíneos (Fig. 11). Estos se liberan al medio extracelular, a la circulación sanguínea y a la circulación linfática, siendo capaces de invadir nuevas células y diseminar la infección. La repetición de esta ronda de invasión y replicación intracelular desencadena la fase aguda de la enfermedad. Eventualmente, los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por un insecto, cerrando así el ciclo (Fig. 11) [20].

Diversidad genética de *T. cruzi*

Las variaciones geográficas en la prevalencia y gravedad de las diferentes formas clínicas de la Enfermedad de Chagas han sido asociadas con aspectos inmunológicos y/o genéticos de las diversas poblaciones humanas, con la vía de entrada del parásito y con la coexistencia de otras infecciones. En los últimos años, además, se ha puesto el foco en el posible rol de la variabilidad genética del parásito en este fenómeno.

Brevemente, y en gran medida debido a su propagación mayormente clonal, *T. cruzi* presenta una población altamente estructurada, compuesta por múltiples cepas o aislamientos que muestran una gran diversidad genética entre ellos [21,22]. La primera clasificación se estableció en una Reunión Satélite llevada a cabo en Fiocruz en 1999 [23], donde se definieron dos subgrupos principales de cepas denominados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Fig. I2.A). Esta clasificación se propuso considerando características biológicas y bioquímicas, así como enfoques moleculares, como los polimorfismos en los genes que codifican para el mini-exón y el ARN ribosomal 24Sα. Diez años más tarde, a través de la implementación de análisis de genotipificación multilocus, se reveló la presencia de seis unidades discretas de tipificación (*Discrete Typing Units*, DTUs) [21], las cuales se clasificaron en dos subdivisiones principales llamadas DTU I y DTU II. Las DTUs se definen como ‘conjunto de cepas genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra y que son identificables por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes’ [24]. Además, basándose en información filogenética obtenida a partir de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), la DTU II se dividió en cinco DTUs (IIa-e) [25,26], correspondiendo las DTUs I y IIb a los grupos *T. cruzi* I y *T. cruzi* II de 1999, respectivamente (Fig. I2.B). Esta nueva clasificación consideró a las DTUs I y IIb como ancestrales, a las IIa y IIc como híbridos ancestrales y a las IId y IIe como productos de un mínimo de dos eventos de hibridación [27–29]. Sin embargo, una segunda revisión en ese mismo año (2009) propuso una clasificación final en seis DTUs, llamadas TcI a TcVI (Fig. I2.C) [21]. En este caso, las TcI y TcII eran las DTUs ancestrales; TcIII y TcIV, aquellas con al menos un evento aparente de recombinación entre TcI y TcII (híbridos homocigotos); y TcV y TcVI, híbridos heterocigotos surgidos a partir de eventos relativamente recientes de recombinación entre parentales TcII y TcIII. Un nuevo grupo de cepas, muy divergentes y detectadas inicialmente en murciélagos, también se incluyó en la clasificación como TcBat [30]. Con estudios posteriores basados en diversos marcadores moleculares, se propuso considerarla como la séptima DTU [31]. Finalmente, debe mencionarse que en 2016 se

cuestionó la validez estadística de esta clasificación (Fig. I2.D) [32]. Una reconstrucción filogenética basada en la variación intraespecífica de secuencias mitocondriales llevó a proponer la existencia de tres grupos de cepas en *T. cruzi*: los mtTcI y mtTcII, como ancestrales; y el mtTcIII, que agrupa todas las cepas híbridas. TcBat se incluyó como un grupo independiente, aunque filogenéticamente relacionado con mtTcI.

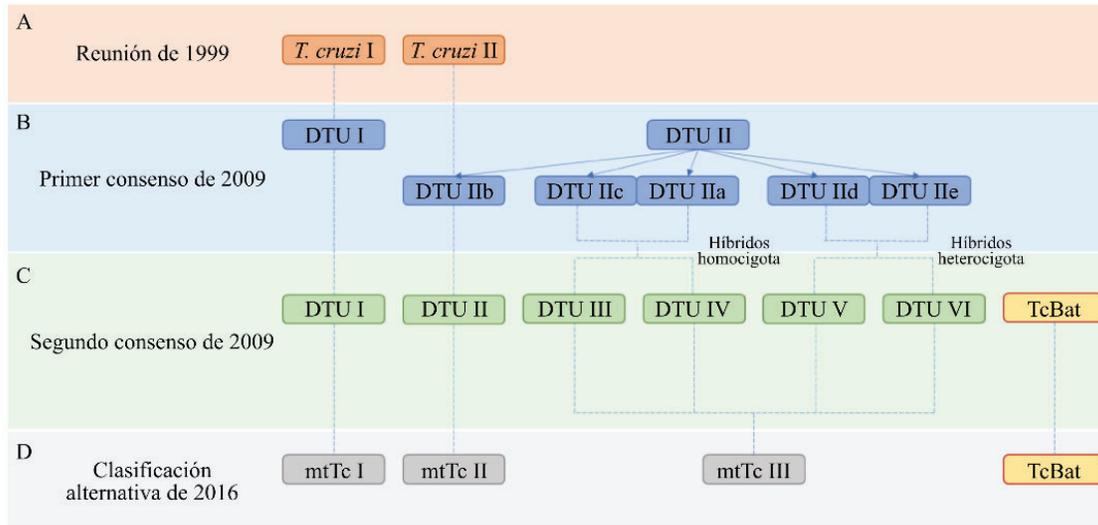
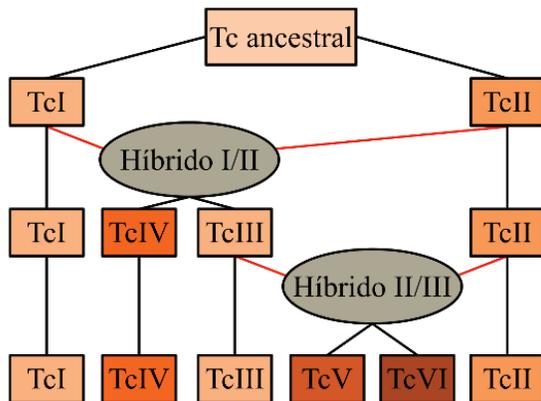


Figura I2: Esquema de la evolución de la clasificación de *T. cruzi*. A: Resultado de la reunión de 1999; B: Primer consenso en 2009; C: Segundo consenso en 2009; D: Clasificación alternativa en 2016. Adaptado de [33].

Actualmente, tras diversos estudios de tipificación molecular realizados en múltiples aislamientos o cepas del parásito, la clasificación más aceptada identifica al menos seis linajes evolutivos o DTUs (TcI a TcVI; Fig. I2.C). Aunque se han propuesto varios modelos alternativos para explicar la evolución de *T. cruzi*, todos coinciden en la ancestralidad de TcI y TcII, y en que TcV y TcVI resultan de eventos de hibridación ‘reciente’ entre los parentales TcII y TcIII (Fig. I3) [34]. Estos linajes evolutivos o DTUs muestran fenotipos muy diversos en cuanto a infectividad en el insecto vector; diferentes parámetros relacionados con la invasión y multiplicación intracelular en el hospedador mamífero (determinados *in vitro*); susceptibilidad a drogas; tropismo tisular; y/o virulencia en modelos animales definidos [35–38]. Más aún, aunque la situación eco-epidemiológica no está completamente definida, diversos estudios sugieren diferencias en la distribución geográfica, así como en el rango de hospedadores mamíferos y especies de insectos vectores de las distintas DTUs. Los linajes TcIII y TcIV se encuentran principalmente asociados a ciclos de infección selváticos (con TcIV más representado en el norte de Sudamérica, así como en Centro y Norteamérica), mientras que TcII, TcV y TcVI parecen estar relacionados con ciclos de infección

peridomésticos y/o domésticos, sobre todo en el extremo sur de Sudamérica [37,39,40]. TcI, en cambio, presenta una distribución ubicua, siendo una de las DTUs más prevalentes tanto en ciclos selváticos como domésticos. Además, y debido a su ancestralidad, TcI es una de las DTUs con mayor variabilidad interna.

A. Doble hibridación



B. Tres ancestros

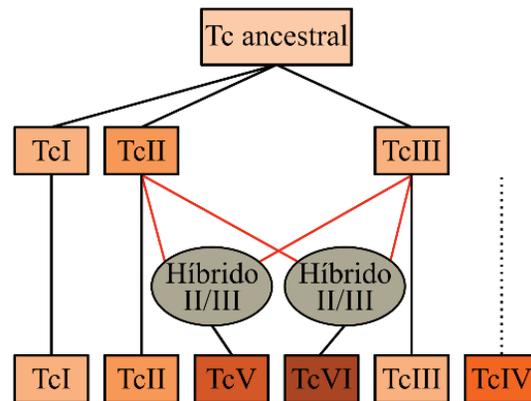


Figura 13: Modelos evolutivos de las DTUs de *T. cruzi*. Esquema comparativo de los modelos de ‘doble hibridación’ y ‘tres ancestros’. Las distintas DTUs se indican dentro de rectángulos de distintos colores mientras que los eventos de hibridación se indican con óvalos con los parentales unidos por líneas rojas. Adaptado de [34].

Aspectos genómicos de *T. cruzi*

En el año 2005, se reportó el primer genoma de *T. cruzi*, correspondiente a la cepa híbrida CL Brener (TcVI). Este genoma está representado por dos conjuntos de *contigs*, cada uno derivado de un haplotipo parental, conocidos como 'Esmeraldo-like' o 'non-Esmeraldo-like' [41]. Esta primera versión reveló una gran complejidad, con más del 50% del genoma compuesto por secuencias repetitivas, elementos transponibles, ADN satélite y grandes familias multigénicas (ver más abajo), que en su conjunto conforman lo que posteriormente se definió como el compartimento ‘disruptivo’ [5]. Estas características, junto con la naturaleza híbrida de CL Brener, resultaron en un ensamblaje del genoma altamente fragmentado [41], que, aunque no alcanzó la calidad esperada, ha servido de referencia para numerosas investigaciones durante varios años. Con el advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva, se obtuvieron los genomas de organismos filogenéticamente relacionados, como *Trypanosoma cruzi marinkellei* [42], *Trypanosoma rangeli* [43], *T. brucei* [44] y distintas especies de Leishmanias [45], así como de otras cepas de *T. cruzi* correspondientes a distintas DTUs, entre las que se encuentran Y (TcII), Sylvio X10/1, G y Dm28c (todas ellas TcI) [46–49]. Más recientemente, la utilización de métodos de

secuenciación de tercera generación (*next-generation sequencing*, NGS), basados en lecturas largas (PacBio, Nanopore), ha mejorado sustancialmente el ensamblaje de los genomas de *T. cruzi* y, sobre todo, la resolución de sus regiones repetitivas [46,50]. Estos avances permitieron obtener ensamblajes de alta calidad de los genomas de cepas como Berenice (TcII), TCC (TcVI), Y, Brazil A4 (TcI) y Dm28c [5,50–52]. La anotación funcional de estos genomas, sin embargo, en muchos casos no está disponible o consiste en una migración de anotaciones espurias y erróneas de otros genomas usados como referencia, particularmente el de CL Brener. Como consecuencia, las búsquedas bioinformáticas suelen ser poco informativas, lo que dificulta la realización de estudios de genómica funcional en este organismo y obliga a los investigadores a realizar análisis exhaustivos y correcciones manuales *de novo* [53,54].

Familias multigénicas de *T. cruzi*

T. cruzi se distingue (aún entre los propios tripanosomátidos) por poseer varias familias multigénicas, algunas de las cuales contienen cientos de miembros con menor o mayor grado de polimorfismos entre ellos, lo que contribuye a la naturaleza repetitiva del genoma del parásito. La mayoría de estas familias multigénicas codifican para proteínas de superficie (glicocalix) que desempeñan diversos roles en el ciclo de vida del parásito, en su interacción con el insecto vector y/o con el hospedador mamífero, y/o en su patogenicidad. Estos roles van desde el establecimiento de una interacción efectiva con la célula blanco (adhesión, señalización, internalización, replicación, co-optación de mecanismos y/o vías de señalización, etc.), hasta la protección contra el sistema inmune del hospedador. Al considerar a todas las cepas en conjunto, la familia multigénica más ampliamente representada es la de las *trans*-sialidasas (TS), seguida por las mucinas (particularmente las expresadas en los estadios del mamífero, TcMUC), las *mucin-associated surface proteins* (MASPs), las metaloproteasas de masa molecular (Mr) aparente de 63 kDa (GP63), las *serine-, alanine- and proline-rich proteins* (SAP), las *trypomastigote alanine-, serine- and valine-rich proteins* (TASV), las *Dispersed Gene Family-1* (DGF-1), las *Retrotransposon hot spot proteins* (RHS) y las glicosiltransferasas, entre otras [33,54–60].

Estudios de genómica comparativa evidenciaron que estas familias experimentan una evolución constante, incluyendo amplificación/contracción de su dosaje genético, recombinación entre sus miembros y/o diversificación (con eventual pseudogenización) de las copias génicas por acumulación de mutaciones, lo que tiene un impacto significativo en la diversidad genética global entre las cepas [61]. Más aún, dada la relevancia funcional de las

moléculas codificadas por estas familias multigénicas, se ha especulado que la variabilidad cuanti- o cualitativa de estas estaría asociada, al menos en parte, con las diferencias fenotípicas entre las cepas de *T. cruzi* [62–64]. En línea con esta hipótesis, el análisis del genoma de *T. rangeli*, un parásito estrechamente relacionado con *T. cruzi*, pero que no es patogénico para el humano, mostró una reducción masiva en el dosaje y variabilidad de familias multigénicas tales como mucinas, MASP y TS [48].

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos esfuerzos con el fin de capturar la diversidad de las familias multigénicas entre cepas de *T. cruzi*. A pesar de su potencial relevancia e impacto en distintos aspectos de la investigación básica y aplicada en este parásito, estos estudios comparativos se han visto limitados a pocos genomas y, más importante aún, suelen contener serios sesgos metodológicos, ya que comparan genomas ensamblados usando distintas tecnologías de secuenciación y/o diferentes tipos de anotación.

El flagelo de *T. cruzi*

Una característica distintiva de *T. cruzi*, y tripanosomátidos en general, es la presencia de un único flagelo. En tripomastigotes, el flagelo se origina en el extremo posterior de la célula y posee una porción que se encuentra anclada a lo largo de todo el cuerpo celular mientras otra, pequeña, emerge libre por el extremo anterior. Esta disposición es la base morfológica de la llamada ‘membrana ondulante’, típica del estadio tripomastigote y muy relevante para su infectividad y motilidad en fluidos extracelulares [65]. En epimastigotes, por el contrario, el flagelo se origina en el extremo anterior del parásito, donde una pequeña fracción se ancla al cuerpo y luego emerge como una organela libre. En amastigotes, solo se encuentran un flagelo incipiente y no funcional en términos de motilidad (Fig. I4) [65].

El flagelo de tripanosomátidos emerge del cuerpo celular a través del bolsillo flagelar (el único sitio donde se disrumpe el corset de fibras subpeliculares que dan rigidez y forma al parásito) [66], y se encuentra unido lateralmente mediante la zona de anclaje flagelar, una especialización compleja de microtúbulos conectada al citoesqueleto a través de dos membranas de localización basal. Desde un punto de vista estructural, el flagelo de los tripanosomátidos consiste en un axonema con configuración de nueve pares de microtúbulos periféricos y un par central (9+2, conservado en eucariotas), y un bastón paraflagelar, compuesto por unas pocas proteínas conservadas entre los distintos organismos, que le confiere mayor rigidez y fuerza [66,67].

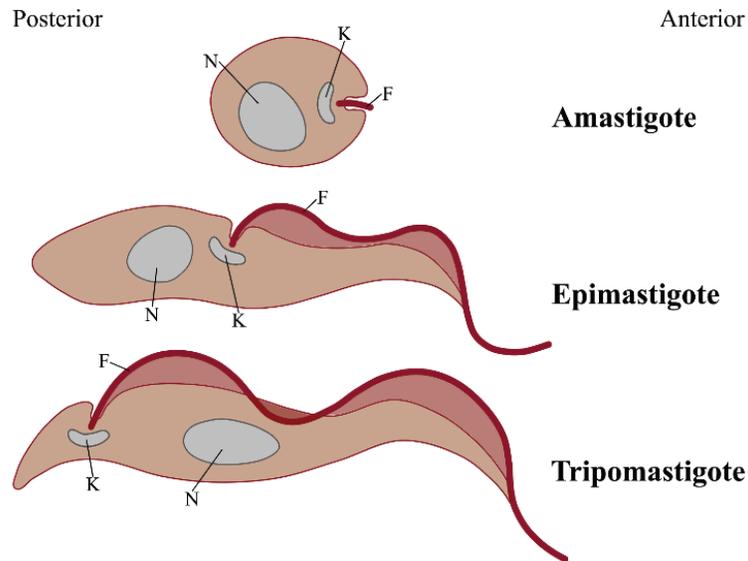


Figura 14: Disposición del flagelo de *T. cruzi*. Esquema representativo de las principales formas celulares de *T. cruzi*, donde se indica la localización del flagelo (F) en relación a la posición del kinetoplasto (K) y del núcleo (N).

La principal función del flagelo en tripanosomátidos está asociada a la propulsión, donde el movimiento flagelar es impulsado por la acción de dineínas, proteínas motoras que deslizan los microtúbulos entre sí, generando ondas que propulsan el parásito. La membrana ondulante amplifica las fuerzas generadas, permitiendo una motilidad eficiente en fluidos viscosos como la sangre. Se demostró que, en tripanosomátidos, el flagelo juega roles clave en la morfogénesis celular. Junto con el citoesqueleto subpelicular, participa en la determinación de la forma celular y en la correcta distribución de organelas durante la división celular [68]. Además, está involucrado en la interacción con distintos tipos de sustrato, un proceso clave para, por ejemplo, promover la colonización y la diferenciación a formas metacíclicas dentro del insecto vector, así como la invasión de distintos tipos de células y la evasión de la respuesta inmune en el mamífero hospedador [69–71]. También participa en la segregación del ADN mitocondrial, dado que se encuentra físicamente conectado al kinetoplasto que lo contiene [72]; en la división celular, ayudando a coordinar la separación de las células hijas [73] y en los mecanismos de endo- y exocitosis, ya que el bolsillo flagelar facilita la ingestión de nutrientes y la secreción de factores de virulencia, procesos esenciales para la adaptación y supervivencia del parásito [66]. Existen múltiples evidencias de que los componentes flagelares son muy antigénicos [74,75], y de que están asociados a la inducción de respuestas inmunoprotectoras en infecciones experimentales [76]. Adicionalmente, se los ha vinculado al desarrollo de patologías del tipo autoinmune [77], distintivas de la Enfermedad de Chagas.

TolT (*TolA-like protein from T. cruzi*)

En el año 1990, en un intento de identificar antígenos del parásito, el grupo de Jerry Manning produjo hibridomas derivados de células de bazo de ratones infectados con la cepa Perú de *T. cruzi* y evaluó la reactividad de los anticuerpos monoclonales generados. Uno de estos anticuerpos, denominado mAb20H1, reconoció de manera específica a un antígeno (llamado inicialmente 20H1) cuya expresión resultó ser exclusiva del estadio tripomastigote (Fig. 15.A). Mediante ensayos de *Western blot* (WB), se observó que este anticuerpo reconocía varias bandas de Mr aparente similar, entre 34 y 45 kDa, dependiendo de la cepa estudiada (Fig. 15.B), sugiriendo que se trataba de una familia de antígenos relacionados, con polimorfismos de secuencia y/o modificaciones post-traduccionales distintas [75]. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) mostraron que la localización de los antígenos 20H1 se restringía a la superficie del flagelo en contacto con el cuerpo celular (Fig. 15.C).

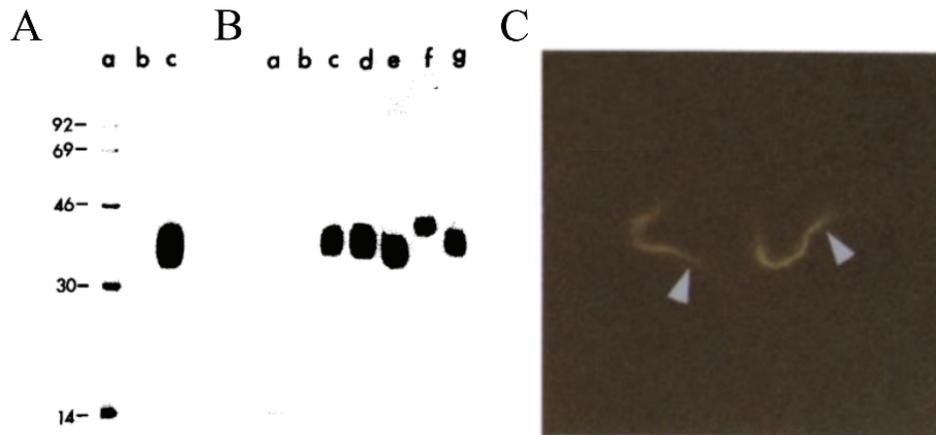


Figura 15: Expresión y localización del antígeno 20H1 de *T. cruzi*. A y B) Análisis de WB revelados con el anticuerpo mAb20H1. A) (a) *marker* de Mr; lisado de epimastigotes (b) y tripomastigotes (c) de la cepa Peru. B) (a) *marker* de Mr; lisado de epimastigotes de la cepa CL Brener y tripomastigotes de las cepas CL Brener (b), Esmeraldo (d), Peru (e), Sylvio X-10 (f) e Y (g). C) Localización del antígeno 20H1 por IFI en tripomastigotes de la cepa Peru. Las puntas de flecha marcan la posición del flagelo. Adaptado de [78].

Más tarde, el mismo grupo describió (en la cepa Esmeraldo) que estos antígenos estaban codificados por al menos tres genes altamente relacionados (>98.9% de identidad nucleotídica), dispuestos en tándem cabeza-cola, y que las proteínas deducidas a partir de estos tenían homología con el dominio II de las proteínas TolA de bacterias como *Escherichia coli* (*E. coli*; 32% de identidad en una superposición de 229 aminoácidos, aa) y *Pseudomonas aeruginosa* (34% de identidad en una superposición de 195 aa), por lo que les fue asignado el nombre 'TolT' (*TolA-like protein from T. cruzi*) [78]. Las proteínas TolA, de distribución ubicua en bacterias Gram-negativas, son componentes clave del sistema Tol-Pal,

involucrado en la integridad y estabilidad de la envoltura celular [79], y estructuralmente poseen una hélice transmembrana N-terminal (dominio I) y una región periplásmica, formada por una segunda hélice, más larga (dominio II), y un dominio globular C-terminal (dominio III) [80].

En ese mismo trabajo, mostraron que las proteínas TolT son blanco de la respuesta inmune celular durante la infección experimental con *T. cruzi*, por lo que fueron propuestas como un potencial reactivo vacunal [78].

En el año 2008, se mostró que, además de gatillar una respuesta celular adaptativa, las proteínas TolT presentan reactividad contra anticuerpos presentes en el suero de personas infectadas con *T. cruzi*. En base a estos hallazgos, tres secuencias TolT, aunque levemente divergentes de las descritas originalmente (TolT1-3), fueron seleccionadas a partir de un *screening* de más de 400 proteínas del parásito e incluidas (junto a otros 16 grupos) en un potencial reactivo para el diagnóstico serológico y el monitoreo de la eficacia del tratamiento de la Enfermedad de Chagas [81]. Este mismo *set* de antígenos se utilizó como *test* serológico para analizar la correlación entre la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* y la respuesta de las células T en animales infectados experimental o naturalmente, con resultados alentadores [82,83]. Una de las secuencias TolT incluidas en este reactivo multiplexado (denominada ANOF) fue luego utilizada para evaluar en simultáneo la respuesta inmune humoral mediante la detección de anticuerpos específicos y la presencia de células T productoras de interferón- γ (IFN- γ) en pacientes seropositivos y serodiscordantes [84]. Más recientemente, además de ANOF, otras secuencias TolT fueron evaluadas (individualmente o fusionadas a otros antígenos del parásito) como biomarcadores indirectos de eficacia terapéutica [85,86].

Además de sus propiedades diagnósticas y aparentemente protectoras, la identificación recurrente de péptidos derivados de proteínas TolT en bases de datos proteómicas del parásito publicadas en los últimos años contribuyó a renovar el interés en estas moléculas. Algunos de los péptidos encontrados en estos repositorios muestran sutiles polimorfismos con las TolT originalmente descritas, sugiriendo fuertemente que la complejidad de esta familia de antígenos era mucho mayor a la originalmente descrita [83,87–91]. Desde un punto de vista práctico, esta subestimación podría comprometer su aplicabilidad en desarrollos diagnósticos y terapéuticos. Más interesante aún, estos análisis a gran escala permitieron identificar a TolT como un componente mayoritario no solo en fracciones flagelares o de membrana del tripomastigote de *T. cruzi*, sino también en preparaciones enriquecidas en vesículas secretadas por estas mismas formas, de gran relevancia para el establecimiento de la infección *in vitro* e *in vivo* y para la comunicación

entre parásitos y entre el parásito con la célula blanco, tanto en *T. cruzi* como en otros protozoarios [92–95]. Además, se encontraron péptidos derivados de TolT en extractos de cromatina de tripomastigotes de *T. cruzi* [96], lo que sugiere localizaciones subcelulares adicionales y funciones complementarias a las asociadas con su disposición en membrana para estas moléculas.

Objetivos

Los datos mencionados anteriormente sugieren que las proteínas TolT constituyen moléculas relevantes para la interacción de *T. cruzi* con el hospedador mamífero, y también un potencial candidato para el desarrollo de nuevas estrategias serodiagnósticas y terapéuticas en Enfermedad de Chagas. En vista de la necesidad urgente de nuevos biomarcadores para *T. cruzi* y teniendo en consideración la abundancia de información genómica de alta calidad y de herramientas moleculares y celulares de precisión para el análisis funcional de este parásito generadas en los últimos años, planteamos como objetivo general de la presente Tesis la re-evaluación de las proteínas TolT de *T. cruzi*. Para cumplimentar este objetivo general, proponemos los siguientes objetivos específicos (OE):

- OE1: Caracterizar la estructura génica de TolT y capturar la variabilidad de estas moléculas en *T. cruzi*
- OE2: Determinar la expresión de TolT durante el ciclo de vida de *T. cruzi*
- OE3: Determinar la estructura antigénica de las proteínas TolT y su modo de reconocimiento en distintas zonas endémicas
- OE4: Caracterizar funcionalmente a las proteínas TolT

Resultados

1. Identificación y caracterización de genes TolT en *T. cruzi*

TolT constituye una familia génica compleja de tripanosomátidos

Como primer acercamiento, al inicio de esta Tesis (en 2018), se llevaron a cabo búsquedas en las bases de datos genómicas de kinetoplastidos compiladas en TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), utilizando como secuencia señuelo el marco abierto de lectura (*open reading frame*, ORF) de TolT1 (GenBank: AF099099.1) [78]. Las secuencias obtenidas fueron descargadas, alineadas y curadas manualmente (verificando si correspondían a genes completos, parciales o pseudogenes y corrigiendo anotaciones erróneas) para luego construir un árbol filogenético preliminar, el cual permitió la identificación de tres grupos de genes TolT putativos, a los que llamamos TolT-A, TolT-B y TolT-C; con TolT1 ubicada dentro del grupo TolT-A (datos no mostrados). Luego se procedió a realizar nuevas búsquedas utilizando ahora como señuelos los ORFs de miembros representativos de cada uno de los grupos definidos (A: TcCLB.508767.20, B: TcCLB.510433.20, C: TcCLB.506815.20), todos ellos provenientes del clon híbrido de referencia CL Brener de *T. cruzi* [41]. Se obtuvo así un total de 43 secuencias no redundantes, mostrando similitud significativa (>40% de identidad nucleotídica) a partir de diferentes tripanosomas, todos ellos pertenecientes al grupo Estercoraria (transmitidos por las heces de los insectos vectores). De estas secuencias, 38 fueron identificadas en distintos aislamientos de *T. cruzi*, cuatro en el parásito de murciélagos *T. cruzi marinkellei* [97] y una en el patógeno humano *T. rangeli* [98]. Otras búsquedas, basadas en los productos proteicos deducidos a partir de los genes antes mencionados (TcCLB.508767.20, TcCLB.510433.20 y TcCLB.506815.20), permitieron identificar una secuencia adicional (DQ04_05721021) en el parásito reptiliano *Trypanosoma grayi* [99], mientras que ninguna secuencia se encontró en el grupo Leishmaniinae (que incluye, entre otros, a los géneros *Leishmania*, *Porcisia*, *Endotrypanum*, *Crithidia* y *Leptomonas*) o en tripanosomas salivales estrictos (grupo Salivaria) como *T. brucei*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax*. Tampoco se encontraron secuencias homólogas a TolT en otros clados de los kinetoplastidos, como los euglenoides y bodonidae. Un árbol filogenético, generado a partir de todas estas secuencias, confirmó la presencia de los tres grupos principales identificados previamente: TolT-A, -B y -C, y reveló algunos posibles grupos menores y/o subgrupos dentro de ellos (Fig. R1.1).

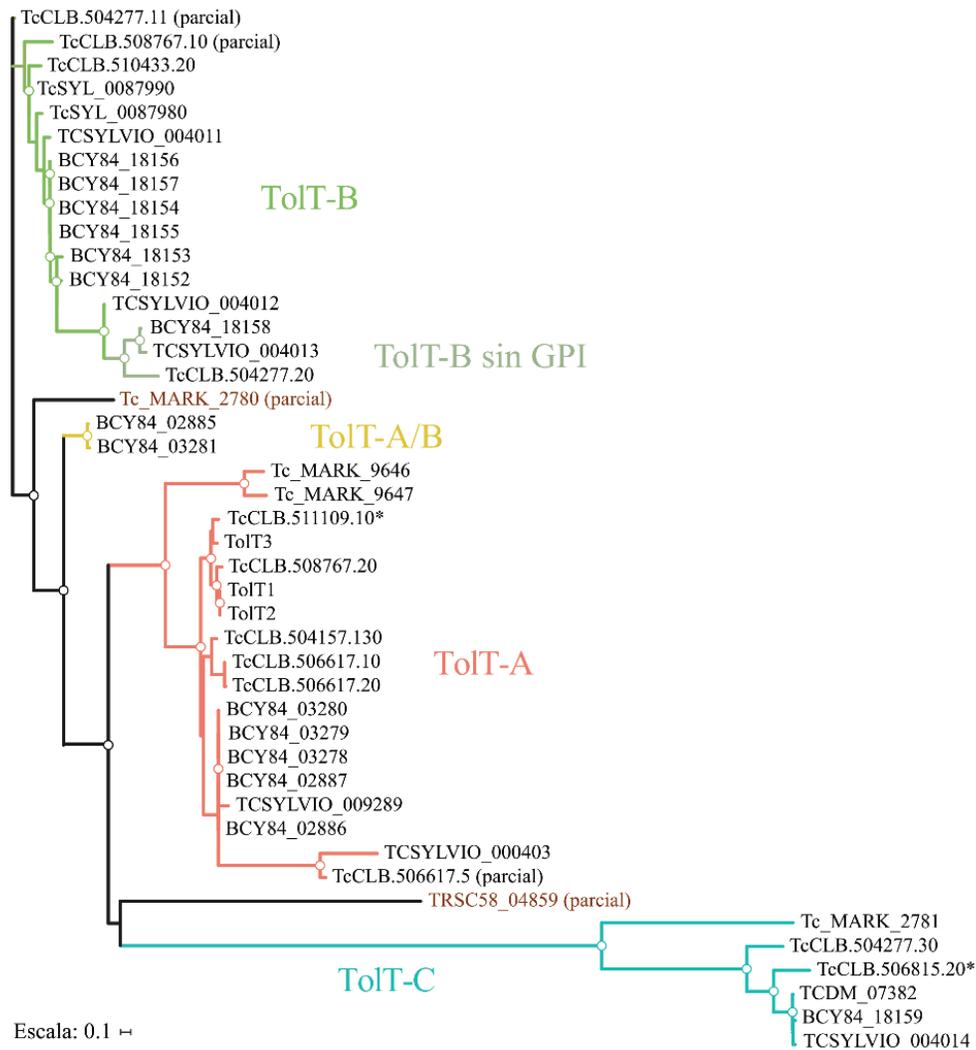


Figura R1.1: Relación evolutiva de los genes TolT en tripanosomátidos (2018). Árbol filogenético no enraizado construido a partir de alineamientos de secuencias de ADN utilizando el método Neighbor-Joining y un *bootstrap* con 1000 permutaciones (valores de soporte >70 se indican con puntos). La escala indica la distancia de sustitución de nucleótidos (nt) a lo largo de las ramas. Las secciones o ramas del árbol están coloreadas según el grupo de TolT asignado y los genes que no pueden incluirse en ningún grupo y los pseudogenes se indican con letras marrones y asteriscos, respectivamente. Adaptado de [100].

Por simplicidad, para el primer análisis de los genes TolT en *T. cruzi*, solo se tuvieron en cuenta las secuencias provenientes de CL Brener. El grupo TolT-A mostró ~96-99% de identidad con TolT1 y consta de cinco secuencias completas (TcCLB.508767.20, TcCLB.506617.10, TcCLB.506617.20, TcCLB.504157.130 y TcCLB.511109.10) y una secuencia parcial (TcCLB.506617.5), con el C-terminal truncado (Fig. R1.1). Como se describió originalmente para los genes TolT1-3 de la cepa Esmeraldo [41], cinco de los genes TolT-A están arreglados en dos tándems en orientación cabeza-cola, uno de tres unidades en

el cromosoma 23P (haplotipo No-Esmeraldo) y otro de dos unidades en el cromosoma 23S (haplotipo Esmeraldo). La sexta secuencia también se localiza en el cromosoma 23P, pero fuera del *cluster* que contiene los tres genes antes mencionados (Fig. S1). TcCLB.511109.10 está anotado como pseudogen debido a la aparente delección de un nucleótido (nt), que origina un corrimiento del marco de lectura. Río abajo de esta mutación, sin embargo, esta secuencia es ~98% y ~96% idéntica a TcCLB.508767.20 a nivel de ADN y proteína, respectivamente, lo que sugiere que este corrimiento sería debido a errores de lectura y/o ensamblaje.

El grupo TolT-B mostró un 76-90% de identidad con TolT1 y está compuesto por cuatro secuencias en CL Brener, dos completas (TcCLB.510433.20 y TcCLB.504277.20) y dos parciales (TcCLB.504277.11 y TcCLB.508767.10), ambas con el N-terminal truncado, probablemente debido a problemas de ensamblado del genoma (Fig. R1.1). Tres de estas secuencias se localizan en el cromosoma 35, una en el haplotipo P y dos en el S, mientras que TcCLB.508767.10 se ubica río abajo de TcCLB.508767.20 dentro del *cluster* genómico de TolT-A en el cromosoma 23P, previamente mencionado (Fig. S1). TcCLB.504277.20 y TcCLB.510433.20 resultaron ser secuencias de distinta longitud (855 vs. 918 nt) y, si bien son idénticas en su N-terminal, divergen hacia su C-terminal. Estas variaciones determinan que la proteína deducida a partir de TcCLB.504277.20 carezca de una señal de anclaje por glicosilfosfatidilinositol (GPI), presente en TcCLB.510433.20 y, generalizando, en todas las TolT (ver abajo). A esta variante la denominamos TolT-B ‘sin GPI’ para diferenciarla de las TolT-B ‘canónicas’ (Fig. R1.2A). Debido a la presencia de secuencias de estructura similar (sin señal de anclaje por GPI) en otros aislamientos del parásito (TCSYLVIO_004012, TCSYLVIO_004013, BCY84_18158), definimos un subgrupo ‘TolT-B sin GPI’ dentro de TolT-B (Fig. R1.1). Cabe aclarar que los alineamientos de las secuencias nucleotídicas de estos genes con las TolT-B canónicas descartan que se trate de un error de secuenciación (datos no mostrados).

TolT-C está compuesto solamente por dos secuencias en CL Brener, las cuales parecen corresponder a alelos de un mismo gen (TcCLB.504277.30 y TcCLB.506815.20; Fig. R1.1) y están localizadas dentro del *cluster* genómico de TolT-B en los cromosomas 35S y 35P, respectivamente (Fig. S1). TcCLB.506815.20 está anotado como pseudogen, aunque no muestra codones *STOP* prematuros ni ninguna otra firma diagnóstica de pseudogenización. A diferencia de los TolT-A y -B, los genes de TolT-C muestran sólo una moderada similitud con TolT1 (~47% de identidad nucleotídica).

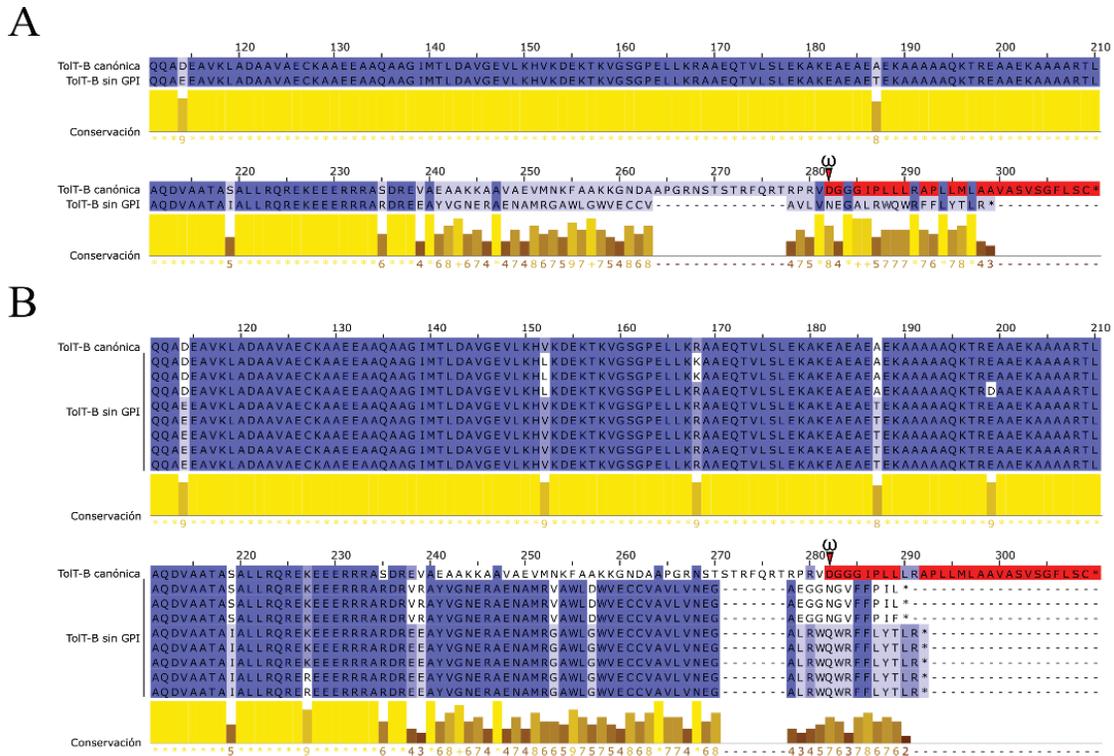


Figura R1.2: Región C-terminal de proteínas TolT-B en *T. cruzi*. Alineamiento de secuencias de aa de una TolT-B canónica (TcCLB.510433.20) y A) una TolT-B sin GPI (TcCLB.504277.20) de la cepa CL Brener o B) TolT-B sin GPI de distintos aislamientos de *T. cruzi* (de arriba a abajo: C4B63_10¹, BCY84_18158, TcBrA4_0101970, TcYC6_0078170, RA_785_4¹, TcCLB.504277.20, ECC02_010564 y JoseJulio_381_4¹). Los residuos fueron coloreados según el porcentaje de identidad y, debajo, se representa en barras amarillas/marrones el grado de conservación entre las secuencias. La secuencia de anclaje por GPI predicha está coloreada en rojo y el aa aceptor del glicolípido (ω) se indica con una punta de flecha. ¹Secuencias no anotadas, sin ID.

Todas las secuencias TolT identificadas en aislamientos de *T. cruzi* agruparon con TolT-A, -B o -C, a excepción de BCY84_02885 y BCY84_03281, ambas del clon Dm28c y casi idénticas entre sí (Fig. R1.1). Para explorar este fenómeno, estas secuencias fueron alineadas con miembros representativos de TolT-A, -B y -C (Fig. R1.3, y datos no mostrados). Se observa que tanto BCY84_02885 como BCY84_03281 son muy similares a TolT-B hasta aproximadamente el nt 365, coincidiendo en 99 de los 111 polimorfismos presentes en esa región (89.2%) para luego (nt 365 a 535) coincidir en 45 de 63 polimorfismos (71.4%) con TolT-A. Río abajo del nt 535, en cambio, se observa que 16 de 32 polimorfismos coinciden con TolT-B (50%), 6 con TolT-A (18.75%) y 10 con ninguna de las dos (31.25%) (Fig. R1.3). Estos datos sugieren que BCY84_02885 y BCY84_03281 son secuencias ‘quiméricas’ entre TolT-A y -B, a partir de las cuales definimos un nuevo grupo dentro de la familia TolT: TolT-A/B (Fig. R1.1).

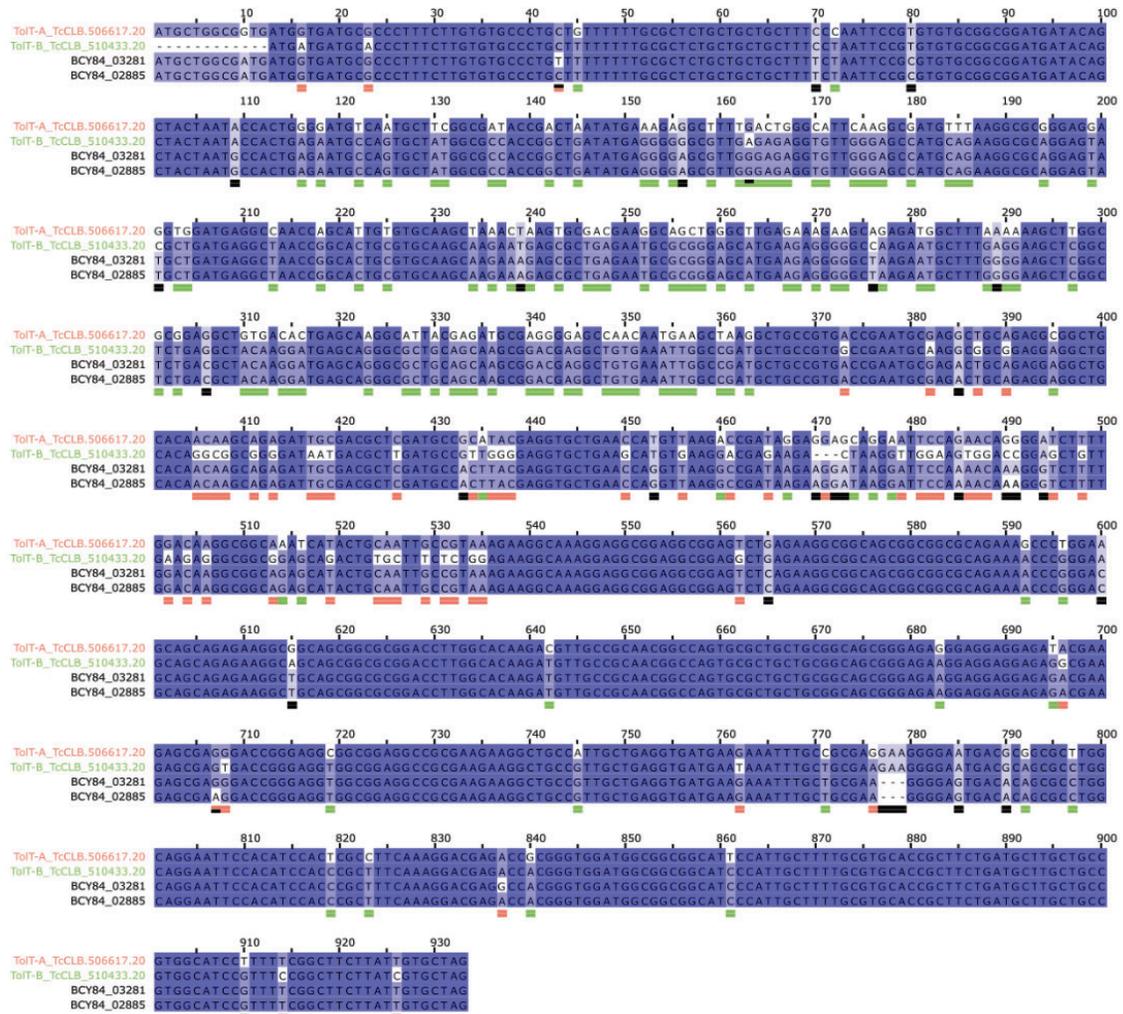


Figura R1.3: Identificación de secuencias TolT-A/B. Alineamiento de secuencias de ADN de BCY84_03281 y BCY84_02885 con secuencias de referencia TolT-A (TcCLB.506617.20) y -B (TcCLB.510433.20). Los nt fueron coloreados según el porcentaje de identidad. Por debajo se indican los polimorfismos de acuerdo a su coincidencia con TolT-A (rojo), -B (verde) o ninguno (negro).

En cuanto a las secuencias TolT identificadas fuera de *T. cruzi*, Tc_MARK_9646 y Tc_MARK_9647 (de *T. cruzi* marinkellei) agruparon con TolT-A, y Tc_MARK_2781 (también de *T. cruzi* marinkellei) con TolT-C (Fig. R1.1). Tc_MARK_2780 (de *T. cruzi* marinkellei) y TRSC58_04859 (de *T. rangeli*), en cambio, se situaron en ramas externas a las ya definidas para los grupos TolT. Al alinearlas con miembros representativos de TolT-A y -B, se confirmó que ambas son secuencias parciales que carecen de parte de su región N-terminal. Tc_MARK_2780 podría clasificarse como TolT-B o -A/B, ya que coincide con TolT-B en 66 de los 102 polimorfismos totales (64.7%), mientras que con TolT-A solo coincide en 11 (10.8%) y en 25 casos no lo hace con ninguna (24.5%; Fig. S2). TRSC58_04859, en cambio, no puede asignarse a ninguno de los grupos, ya que no solo tiene

más polimorfismos (323 en total), sino que además no coincide con ninguno de ellos en 230 casos (71.2%), y los 93 coincidentes se reparten de manera equitativa entre TolT-A (40, 12.4%) y -B (53, 16.4%; Fig. S2). Los alineamientos de TRSC58_04859 con secuencias nucleotídicas de TolT-C tampoco arrojaron resultados satisfactorios (datos no mostrados).

En conjunto, estos resultados indican que TolT constituye una familia génica mucho más amplia y compleja de lo descrito originalmente [78]. Solamente en el genoma de CL Brener se identificaron 12 miembros polimórficos, incluyendo genes y pseudogenes, lo que probablemente sea una subestimación debido a sus conocidos problemas de ensamblaje. Estas secuencias se encuentran distribuidas en tres grupos robustos (TolT-A, -B y -C) y cuentan con ortólogos en todas las cepas de *T. cruzi*, así como en distintas especies de tripanosomátidos, aunque siempre restringidos al clado de los tripanosomas y, más específicamente, al grupo Estercoraria. Un subgrupo de secuencias TolT-B (TolT-B sin GPI) pudo definirse en *T. cruzi* y *T. cruzi marinkellei*, y un aparente cuarto grupo, constituido por posibles quimeras entre TolT-A y -B (TolT-A/B), pudo verificarse sólo en el clon Dm28c de *T. cruzi*.

Recientemente, se ha actualizado este análisis con el objetivo de incluir cepas de *T. cruzi* y otros tripanosomas cuyos genomas han sido secuenciados con posterioridad a 2018. Estas búsquedas, realizadas en TriTrypDB y otros genomas no disponibles públicamente (ver Materiales y métodos), resultaron en 192 secuencias TolT: 180 de *T. cruzi*, de las cepas/clones Brazil A4, Dm28c, G y Sylvio X10/1 (TcI), Berenice e Y C6 (TcII), MT3663 (TcIII), Jose Julio (TcIV), BOL-FC10A (TcV), CL Brener, TCC y RA (TcVI); ocho de *T. cruzi marinkellei*; una de *T. rangeli*; una de *T. grayi*; una de *Trypanosoma theileri* (parásito del ganado bovino, del grupo Estercoraria) [101]; y una de *Trypanosoma melophagium* (patógeno del ganado ovino) [101]. Con una fracción selecta de estas secuencias, se elaboró un nuevo árbol filogenético que muestra una estructura similar a la presentada en la Fig. R1.1, con cinco ramas principales correspondientes a TolT-A, -A/B, -B, -B sin GPI y -C (Fig. R1.4).

Todas las secuencias derivadas de *T. cruzi* y *T. cruzi marinkellei* (salvo Tc_MARK_02 y 2780, probablemente porque son secuencias parciales) se distribuyen dentro de estas ramas principales, con las de *T. cruzi marinkellei*, más divergentes, siempre en posición basal. La única excepción es la rama de TolT-A/B, para la cual no se encontraron representantes en *T. cruzi marinkellei*. Más aún, estas secuencias sólo estarían presentes en aislamientos del linaje TcI de *T. cruzi*. Las secuencias TolT halladas en tripanosomas evolutivamente más distantes (*T. rangeli*, *T. grayi*, *T. theileri* y *T. melophagium*), en cambio, presentan grandes variaciones tanto entre ellas como respecto a las TolT de *T. cruzi* y *T. cruzi marinkellei*, y no se agrupan con TolT-A, -A/B, -B, -B sin GPI o -C (Fig. R1.4).

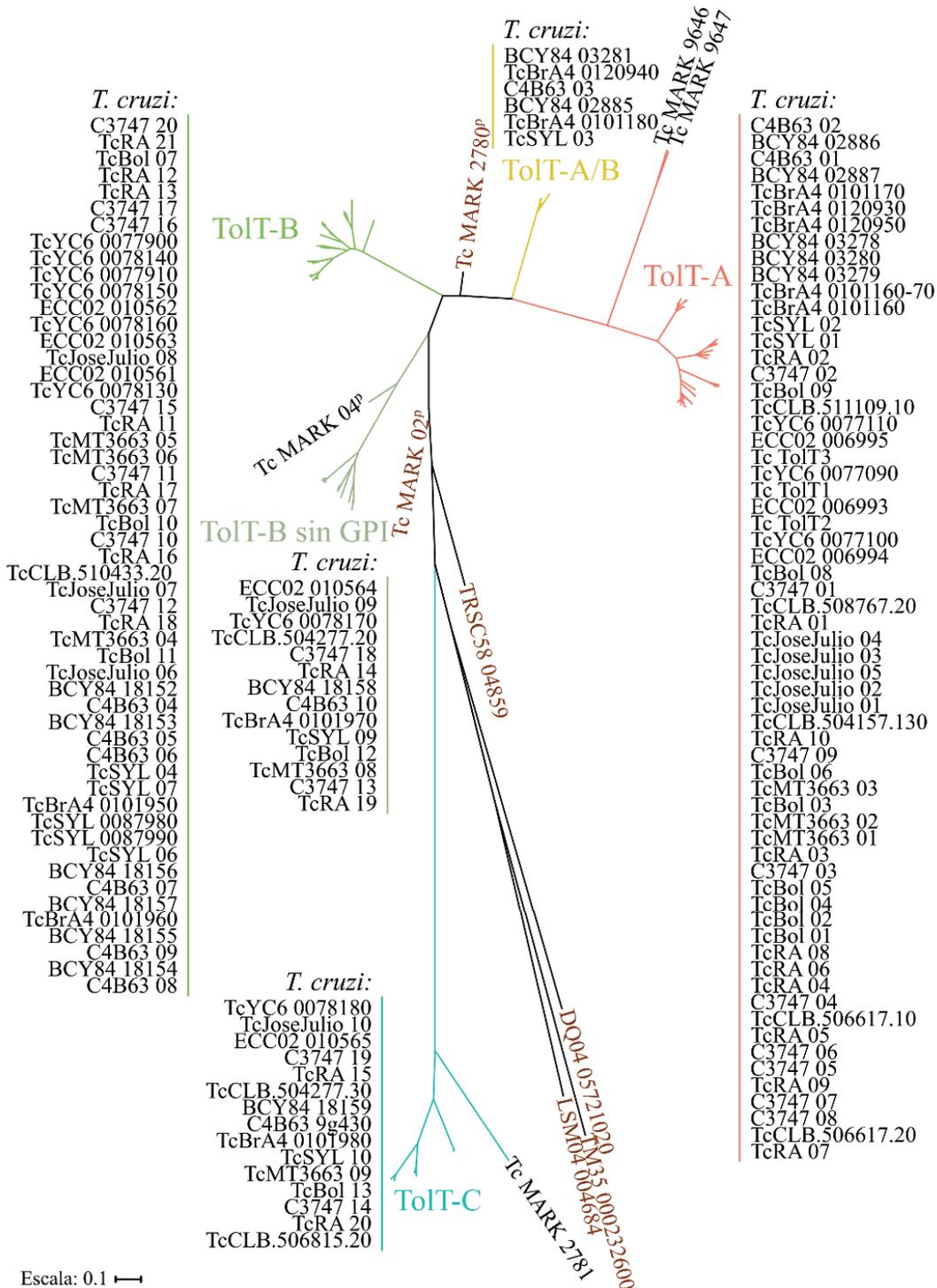


Figura R1.4: Relación evolutiva de los genes TolT en los tripanosomátidos (2024). Árbol filogenético no enraizado construido a partir de alineamientos secuencias de ADN utilizando el método Neighbor-Joining y un *bootstrap* con 1000 permutaciones. Los nombres de las secuencias que no pertenecen a *T. cruzi* se muestran en su posición original mientras que las de *T. cruzi* se alistaron para una mejor visualización. La escala indica la distancia de sustitución de nt a lo largo de las ramas. Las secciones están coloreadas según el grupo de TolT asignado y los genes que no pueden incluirse en ningún grupo se indican con letras marrones. ^p secuencia parcial.

Evolución de los genes TolT en tripanosomátidos

Como se mencionó, todos los aislamientos de *T. cruzi*, así como de *T. cruzi marinkellei*, presentaron miembros de los tres grupos principales (TolT-A, -B y -C). También se encontró en todos ellos la variante de TolT-B sin GPI, descrita previamente (Fig. R1.2B), mientras que el grupo TolT-A/B solo se detectó en Dm28c y otros aislamientos TcI de *T. cruzi*, sugiriendo que se trata de una innovación propia y distintiva de esa DTU. El número estimado y las características de las secuencias identificadas se detallan en la Tabla R1.1.

Tabla R1.1: Secuencias TolT en tripanosomátidos.

DTU	Organismo, cepa	Nº total de secuencias	Nº de secuencias parciales (%)	Nº de genes (%)	Nº de pseudogenes (%)
I	<i>T. cruzi</i> , Brazil A4	12	1 (8.3)	6 (50)	5 (41.7)
	<i>T. cruzi</i> , Dm28c 2014	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)
	<i>T. cruzi</i> , Dm28c 2017	15	0 (0)	15 (100)	0 (0)
	<i>T. cruzi</i> , Dm28c 2018	11	0 (0)	7 (63.6)	4 (36.4)
	<i>T. cruzi</i> , G	7	6 (85.7)	1 (14.3)	0 (0)
	<i>T. cruzi</i> , Sylvio 2012	6	3 (50)	2 (33.3)	1 (16.7)
	<i>T. cruzi</i> , Sylvio X10/1	10	0 (0)	1 (10)	9 (90)
II	<i>T. cruzi</i> , Berenice	8	0 (0)	8 (100)	0 (0)
	<i>T. cruzi</i> , Y C6	12	1 (8.3)	8 (66.7)	3 (25)
III	<i>T. cruzi</i> , MT3663	9	0 (0)	8 (88.9)	1 (11.1)
IV	<i>T. cruzi</i> , Jose Julio	10	0 (0)	9 (90)	1 (10)
V	<i>T. cruzi</i> , BOL-FC10A	13	0 (0)	12 (92.3)	1 (7.7)
VI	<i>T. cruzi</i> , CL Brener	13	4 (30.8)	8 (61.5)	1 (7.7)
	<i>T. cruzi</i> , CL	12	8 (66.7)	4 (33.3)	0 (0)
	<i>T. cruzi</i> , RA	21	0 (0)	15 (71.4)	6 (28.6)
	<i>T. cruzi</i> , TCC	20	0 (0)	14 (70)	6 (30)
-	<i>T. cruzi marinkellei</i> , B7	8	5 (62.5)	3 (37.5)	0 (0)
	<i>T. rangeli</i> , SC58	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)
	<i>T. theileri</i> , isolate Edinburgh	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)
	<i>T. melophagium</i> , StKilda	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)
	<i>T. grayi</i> , ANR4	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)

Dada la naturaleza repetitiva del genoma de *T. cruzi*, se llevó a cabo un análisis cuantitativo más detallado solo con aquellos aislamientos secuenciados mediante métodos NGS basados en lecturas largas: Dm28c 2018 (TcI), Berenice (TcII), MT3663 (TcIII), Jose Julio (TcIV), BOL-FC10A (TcV), RA y TCC (ambos TcVI). Se cuantificó el número de genes y pseudogenes para cada grupo de TolT en cada caso, y se observó que, a excepción de Dm28c (TcI), las cepas pertenecientes a DTUs ancestrales (TcI-IV) muestran un número similar de genes de cada grupo. En contraste, las cepas TcV y TcVI presentan, para todos los grupos, una duplicación de dosaje consistente con su carácter híbrido, así como una tendencia a la pseudogenización en comparación con sus haplotipos ‘parentales’ (TcII y TcIII) [34], inferidos a partir de las cepas Berenice (TcII) y MT3663 (TcIII) (Fig. R1.5).

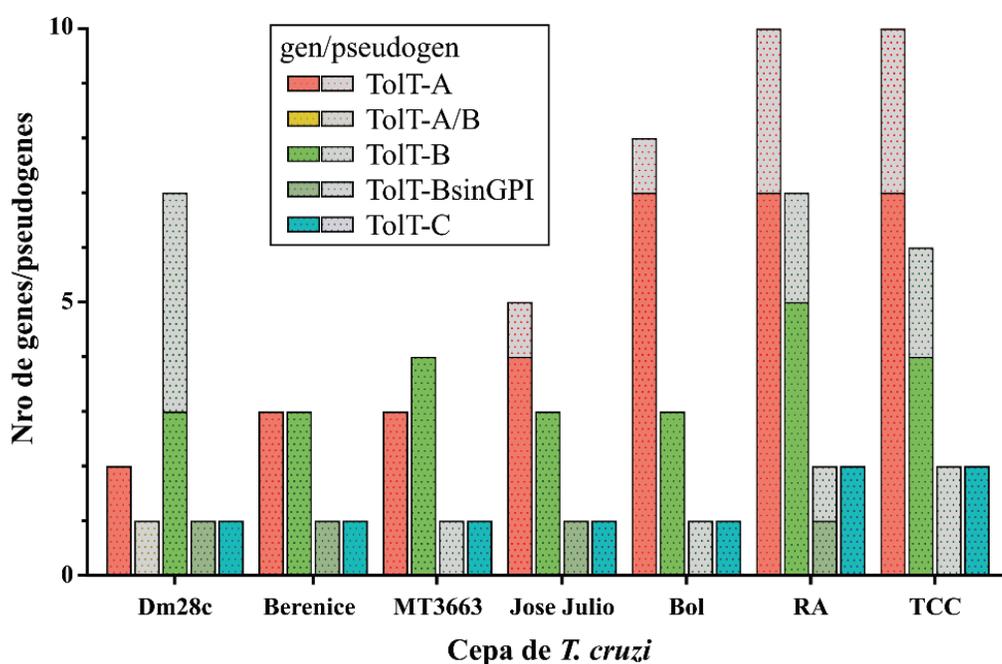


Figura R1.5: Cuantificación de genes y pseudogenes de TolT en *T. cruzi*. Número de genes y pseudogenes de los distintos grupos de TolT en los aislamientos Dm28c 2018 (TcI), Berenice (TcII), MT3663 (TcIII), Jose Julio (TcIV), BOL-FC10A (TcV), RA (TcVI) y TCC (TcVI) de *T. cruzi*. Los genes/pseudogenes TolT-A/B solo se encontraron en Dm28c y otros aislamientos TcI.

Para analizar la distribución de secuencias TolT en el genoma de tripanosomátidos, desarrollamos un protocolo bioinformático, cuya puesta a punto se realizó en la cepa TCC de *T. cruzi*. Primero, utilizando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool N* (BLASTn) local, se identificaron los *contigs* (secuencias contiguas obtenidas tras el ensamblaje de las lecturas crudas) conteniendo genes TolT. Se registró la posición de estos genes dentro de los *contigs* y, cuando fue posible, se tomaron aproximadamente 15.000 nt río arriba y río abajo

para realizar búsquedas de tipo BLASTn en TriTrypDB con el objetivo de identificar marcadores flanqueantes. A partir de estos marcadores, en su mayoría genes con anotación funcional en TCC, se mapearon las regiones genómicas que contenían los *clusters* de genes TolT. Con base en los hallazgos y/o en la longitud del *contig*, se definió el número de nt a inspeccionar, limitándose a las zonas con marcadores determinados, y se extendió el análisis al resto de los genomas.

En conjunto, estos resultados indican que, en *T. cruzi*, los genes TolT están dispuestos en tres *clusters* genómicos: uno compuesto solamente por 3-8 secuencias de TolT-A (*cluster 1*, Figs. R1.6 y S1A), otro integrado por 2-3 secuencias TolT-A generalmente acompañadas por una TolT-B canónica o una TolT-A/B (*cluster 2*, Figs. R1.6 y S1B), y el tercero compuesto por 1-6 miembros de TolT-B canónicas, seguidas de una TolT-B sin GPI y, en el extremo opuesto, una TolT-C (*cluster 3*, Figs. R1.6 y S1C). Al analizar las secuencias TolT de los distintos aislamientos de *T. cruzi*, no se observan diferencias entre las TolT-A que componen al *cluster 1*, mientras que las del *cluster 2*, aunque también son muy similares, muestran cierta divergencia en las cepas/clones TcI. Las TolT-B del *cluster 2* tampoco muestran diferencias entre ellas, así como tampoco las TolT-A/B. Por su parte, el *cluster 3* posee algunas secuencias TolT-B cuyo ATG inicial se presenta 12 nt río abajo del de las demás, presentes solo en las cepas TcIII, V y VI; por lo que las dos últimas las habrían heredado de la primera. El resto de sus secuencias TolT-B son muy parecidas entre sí y están ausentes en TcIII; por lo tanto, serían heredadas por TcV y VI a partir de TcII. Además, estas secuencias presentan una leve divergencia en las TcI, así como una región entre los nt 470 y 500 con dos versiones posibles, más o menos variables dentro de ellas, y presentes en todas las cepas. Los polimorfismos presentes en las secuencias TolT-B sin GPI y -C también reflejan cuáles fueron heredadas por TcV y VI desde el parental TcII (compartidas con TcIV) y cuáles fueron heredadas desde el parental TcIII, así como cierta divergencia en las TcI respecto al resto.

Los *clusters 1* y *2* comparten una estructura notablemente similar, salvo por la inserción de un elemento transponible (L1Tc *non-LTR retrotransposon*) inmediatamente río arriba de las TolT en el primero, y de un *Putative Target of Rapamycin (TOR) kinase 1*, también río arriba de las TolT, en el segundo. Interesantemente, la inserción de esta *TOR kinase 1* se observó en las cepas TcVI estudiadas, aunque no en las TcV. El *cluster 2*, además, se caracteriza por una variación en la composición de sus secuencias TolT entre las DTUs. Las TcI presentan, junto a sus TolT-A, un miembro del grupo minoritario TolT-A/B, mientras que las cepas TcII y IV carecen de TolT-B y las TcV y VI exhiben secuencias canónicas de

las mismas. Todas estas particularidades son potenciales marcadores genéticos que podrían usarse con propósitos de tipificación.

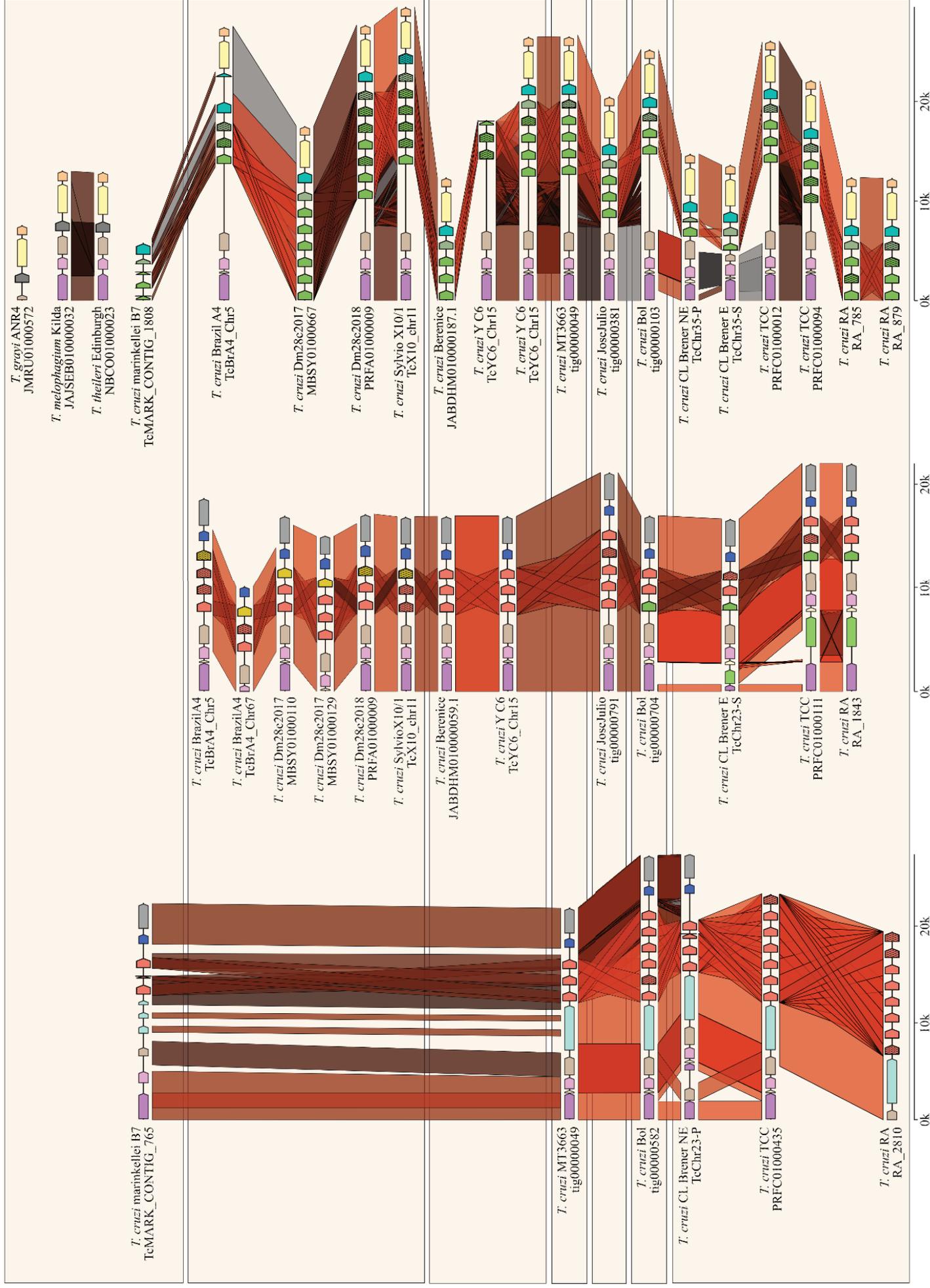
Dentro de los aislamientos pertenecientes a una dada DTU, se encuentran siempre los mismos *clusters* de genes TolT; sin embargo, no todos los *clusters* están presentes en las seis DTUs. El *cluster* 1, por ejemplo, está ausente en las DTUs I, II y IV (Figs. R1.6 y S1A), mientras que el *cluster* 2 está ausente en la DTU III (Figs. R1.6 y S1B). Teniendo en cuenta el modelo de evolución aceptado de *T. cruzi* (Figs. I2 e I3), esto implica que (independientemente de si son o no variantes haplotípicas de una misma región genómica) el *cluster* 1 habría sido heredado por las TcV y VI desde el parental TcIII y el *cluster* 2 desde el parental TcII (Fig. R1.6). El *cluster* 3, por otro lado, está presente en todas las DTUs y habría sido, por tanto, heredado en las DTUs híbridas a partir de ambos parentales (de hecho, en el caso de los aislamientos TcVI, pueden diferenciarse los dos haplotipos de este *cluster*).

Cluster 1

Cluster 2

Cluster 3

Otros
tripanosomátidos



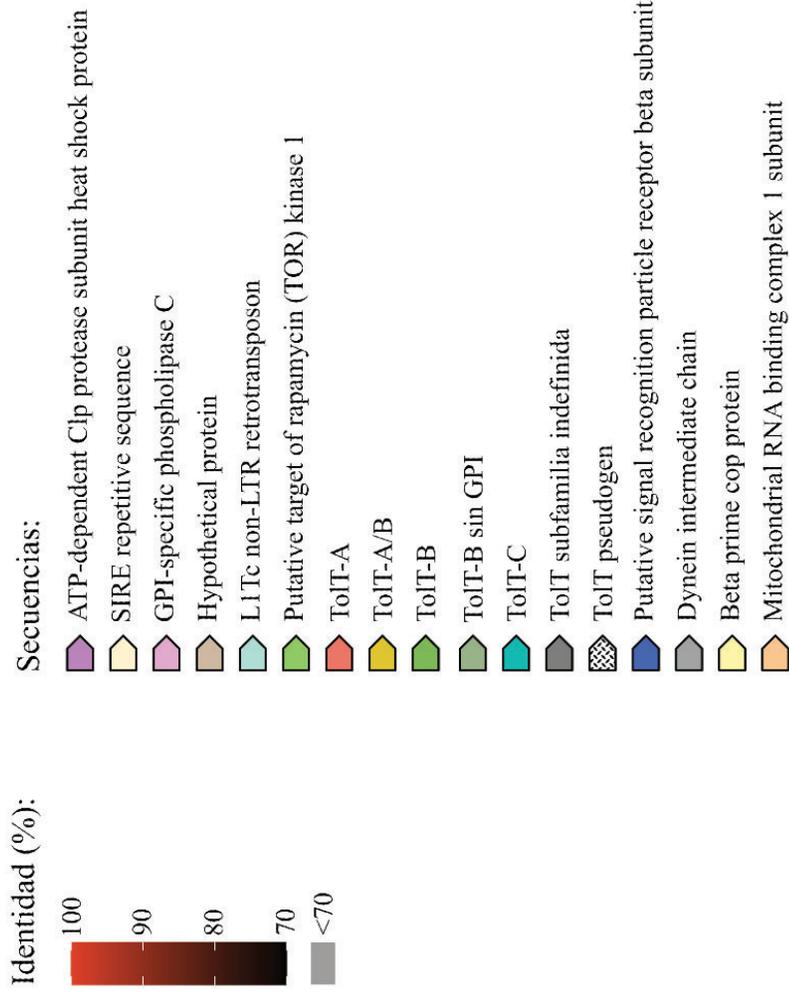


Figura R1.6: Agrupación y sintenia de los genes ToIT. Se esquematizan las regiones genómicas (*clusters* 1, 2 y 3) conteniendo los genes ToIT identificados en *T. cruzi*, *T. cruzi* marinkellei, *T. grayi*, *T. melophagium* y *T. theileri* y, para el caso de *T. cruzi*, se separan las cepas de acuerdo a la DTU a la que pertenecen (Ic1 a VI). En todos los casos se indican los genes ToIT y los marcadores posicionales utilizados en colores de acuerdo a las referencias. El nivel de identidad (%) entre las secuencias se representa por enlaces en la gama del rojo (100%) al negro (70%) o en gris (<70%). Los genes ToIT truncados se indican con una línea vertical donde corresponde. Los *contigs* fueron editados para la correcta visualización de los genes de interés. La escala indica la distancia en nt.

2. Caracterización de proteínas TolT en *T. cruzi*

Las proteínas TolT presentan firmas de localización en superficie y/o secreción

Las proteínas TolT-A, -A/B, -B y -C contienen 309-310, 309, 305-309 y 344 aa, respectivamente, con Mr predichas de entre 30.2-37.6 kDa y puntos isoeléctricos (pI) de 5.9-9.3. Todas ellas muestran secuencias compatibles con la existencia de un péptido señal (SP) clivable en el N-terminal y de una señal de anclaje por GPI en el extremo C-terminal, con la excepción de un subgrupo dentro de TolT-B que carece de la última (TolT-B sin GPI; Fig. R2.1A). Las TolT-B sin GPI son también más cortas que las TolT-B canónicas (282 aa vs 305-309 aa). Estas señales son responsables del tráfico intracelular, la localización en la membrana plasmática y la disposición espacial (con el extremo C-terminal en posición proximal y el N-terminal en posición distal a la bicapa lipídica) de otras glicoproteínas de *T. cruzi*, como mucinas, MASPs y TS [102].

Las proteínas codificadas por los genes TolT presentan un alto contenido de Ala (16-25%), Glu (8-11%), Leu (6-10%), Lys (6-11%) y Arg (4-8%), con algunos de estos aa no igualmente distribuidos a lo largo de sus secuencias (Fig. R2.1A). Además, TolT-A y -B contienen un motivo Cys-X₇-Cys₃ (donde X puede ser cualquier aa) en su SP (Fig. R2.1A).

Las proteínas TolT maduras (las dispuestas en la superficie del parásito, una vez procesados su SP y su señal de anclaje por GPI de acuerdo a predicciones bioinformáticas [103]) mostraron de 17 a 41 sitios potenciales para fosforilación, de 2 a 5 para N-glicosilación, de 27 a 36 para O-glicosilación y 2 residuos Cys conservados, que podrían participar en el plegamiento y/o estabilización de su estructura (Fig. R2.1A). La única característica común y reconocible fue la presencia de dos regiones ricas en Ala con estructura secundaria predicha como hélices α (Fig. R2.1A). Estas regiones y la que las conecta mostraron similitud estructural con el dominio central de las TolA bacterianas. Además, los productos TolT (salvo los TolT-C) presentaron una región particular hacia el extremo C-terminal maduro, enriquecida en residuos de Arg (R) y Glu (E; Fig. R2.1A).

A nivel de aa, resaltan unos pocos polimorfismos entre miembros de TolT-A y -B, siendo la única excepción la región C-terminal de las variantes de TolT-B sin GPI (Fig. S3). Sin embargo, es importante señalar que el grado de identidad entre las TolT-A y -B ‘canónicas’ no es homogéneo. Como se muestra en las Figuras R2.1B y S3, este valor es máximo hacia el SP y la región C-terminal, pero disminuye significativamente hacia la región N-terminal madura (del residuo ~40 al 180). Predicciones de topología sugieren que, de acuerdo con lo reportado para otras moléculas de superficie de *T. cruzi* [104], esta región

constituye el extremo distal a la membrana de las moléculas de TolT, mientras que el extremo proximal sería el C-terminal altamente conservado. En cuanto a TolT-C, la deriva genética de este grupo respecto a TolT-A y -B resulta evidente (Fig. R1.4).

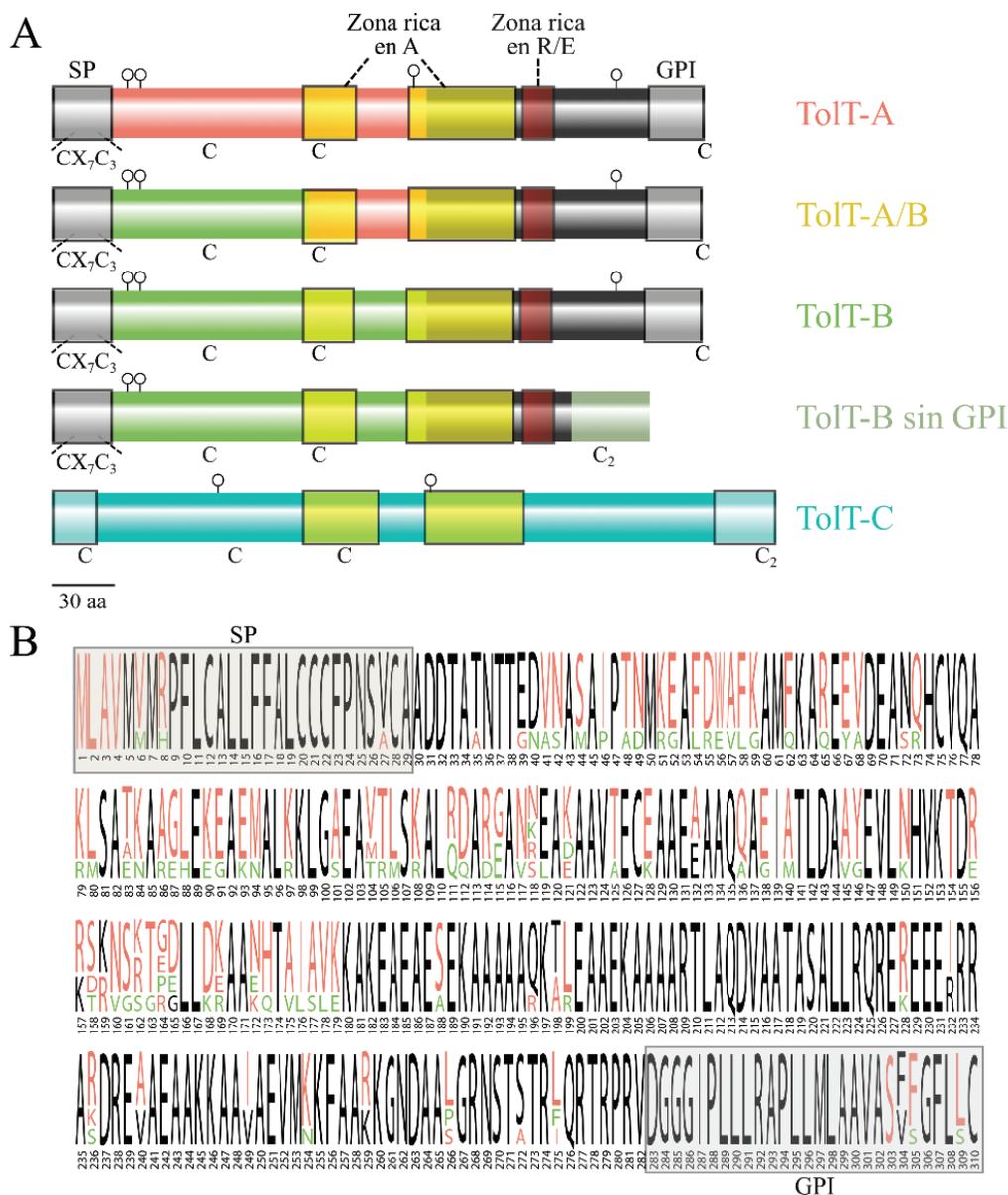


Figura R2.1: Diversidad de proteínas TolT en *T. cruzi*. A) Ilustración esquemática de los productos TolT de *T. cruzi*. Se señalan las secuencias predichas de péptido señal (SP) y anclaje por GPI. Los dominios ricos en Ala (A) y el motivo rico en Arg (R) y Glu (E) se representan como cajas amarillas y rojas, respectivamente; mientras que los sitios de N-glicosilación se indican con *pins*. Se muestran los residuos de Cys (C) conservados. B) Alineamiento de proteínas TolT-A (TcCLB.508767.20, TcCLB.506617.10, TcCLB.506617.20 y TcCLB.504157.130) y -B canónicas (TcCLB.504277.20 y TcCLB.510433.20) de la cepa CL Brener representado en un gráfico de tipo WebLogo. Los residuos distintivos de TolT-A o -B se indican en rojo y verde, respectivamente; mientras que los residuos conservados se indican en negro. Adaptado de [100].

El análisis *in silico* de las proteínas TolT de *T. cruzi* marinkellei, *T. rangeli*, *T. theileri*, *T. melophagium* y *T. grayi* mostró que presentan una identidad de secuencia moderada respecto a las de *T. cruzi* (57-77%, 45-48%, 30-35%, 33-41% y 41%, respectivamente), conteniendo entre 237 y 347 aa, con Mr de aproximadamente 24.8-37.2 kDa y pI de 5.6-8.2. La predicción de SP fue positiva para todas las TolT de *T. cruzi* marinkellei y *T. theileri*, mientras que la de anclaje por GPI lo fue para todas, excepto para el representante de TolT-B sin GPI, encontrado solamente en *T. cruzi* marinkellei.

TolT tiene homología estructural con las Tola bacterianas

Dada la falta de un templatado para llevar a cabo el modelado molecular guiado de las distintas TolT, se generaron modelos *ab initio* mediante AlphaFold [105,106]. En todos los casos, se utilizó la región madura de las proteínas (sin SP ni GPI). Los resultados muestran que todas las proteínas TolT poseen una estructura tridimensional común, ensamblada casi en su totalidad a partir de hélices α , que, a su vez, adoptan una distribución espacial común. Brevemente, pueden distinguirse dos grandes regiones en todas las TolT: una ‘cabeza’ N-terminal compuesta por tres hélices α cortas apiladas y un ‘tallo’ C-terminal, compuesto por la prolongación de solo una de estas hélices α (Figs. R2.2A y B). Este ‘tallo’ termina en una región desordenada (aunque con bajo valor de predicción de *Local Distance Difference Test*, pLDDT), que corresponde al sitio de adición del grupo acilo que determina su anclaje a la membrana plasmática. Para TolT-A (TcCLB.506617.10), estas tres hélices α se extienden desde el aa Met 50 al Leu 99, del aa Lys 108 al Arg 157 y, la más larga, del aa Tre 163 al Arg 268 (Fig. R2.2A). Cada una de estas hélices α se encuentra unida a la siguiente por secuencias cortas que generan una estructura en forma de asa denominada *loop* o giro, que cambia radicalmente la dirección entre las mismas (Figs. R2.2A y B). Al analizarlos detalladamente, se observa que la localización de estos giros coincide con regiones de menor conservación entre los grupos de proteínas TolT (el caso más evidente es representado por el segundo de estos giros, Fig. R2.3A).

Al evaluarse la similitud a nivel de secuencia entre TolT y las Tola bacterianas, se observó que Tola es mencionada en los resultados de una búsqueda de tipo BLASTn para nueve de las doce proteínas de la cepa CL Brener de *T. cruzi*, con un rango de identidad de 29 a 39%. Esta información se confirmó mediante búsquedas de tipo *Basic Local Alignment Search Tool P* (BLASTp), donde para todas las proteínas TolT (incluyendo las TolT-C, más divergentes) se encontraron niveles de identidad aminoacídica de hasta 33.5-44% con proteínas Tola de numerosas especies bacterianas. Puntualmente, al alinear las secuencias de

TolT-A (TcCLB.506617.10) con el dominio II de TolA de *E.coli*, se observó una identidad de aa de apenas 32.4% (Fig. R2.3B). Sin embargo, al comparar los modelos tridimensionales generados a partir de AlphaFold, se observa que, aunque la disposición espacial no coincide de manera exacta, TolT-A (y, por extensión, TolT-B y -A/B) y TolA muestran una gran homología estructural. Ambas están conformadas casi exclusivamente por hélices α conectadas por giros, dentro de las cuales la de mayor longitud se extiende como un tallo y actúa como un espaciador molecular entre la membrana y la ‘cabeza’, formada por un apilamiento de tres hélices α (Fig. R2.2C). Resultados muy similares se obtuvieron al comparar los modelos generados por AlphaFold a partir de proteínas TolT-C (TcCLB.504277.30; Fig. R2.2B) y TolA (datos no mostrados).

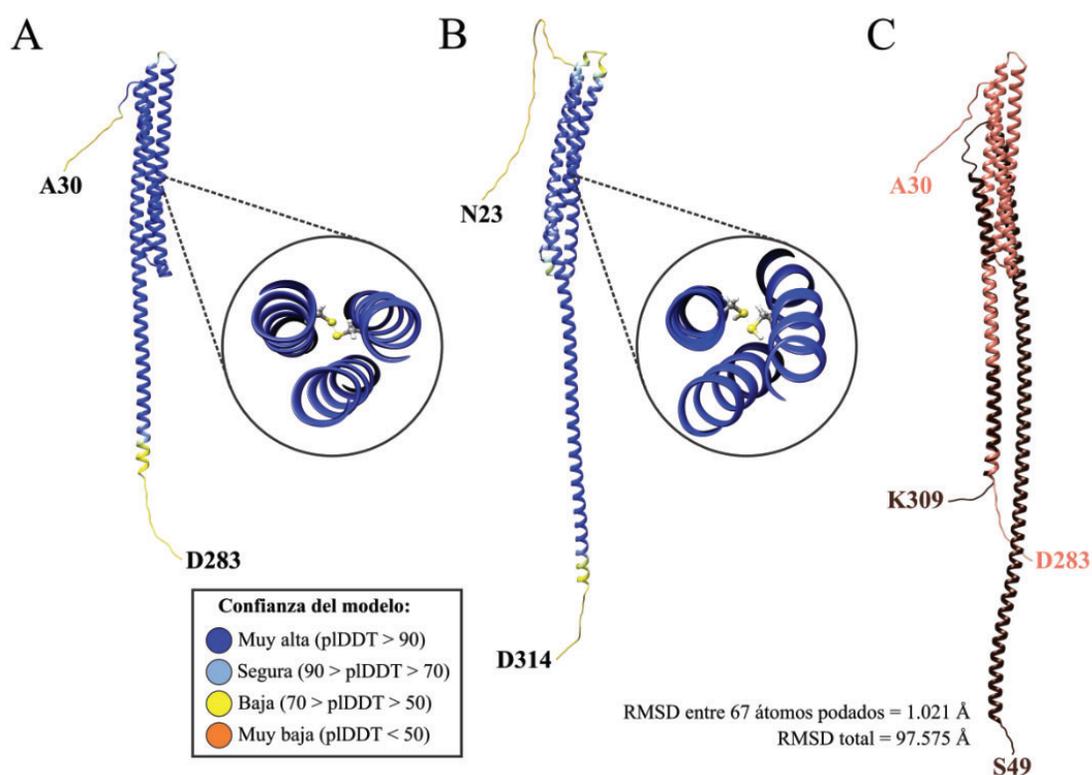


Figura R2.2: Estructura de TolT. Estructuras de TolT-A (A) y -C (B) maduras, predichas por AlphaFold y coloreadas según valores de pLDDT. En los círculos se muestran las Cys 75 y 127 y 87 y 139 de TolT-A y -C, respectivamente. Los átomos de azufre se indican en amarillo. C) Superposición de estructuras de TolT-A (rojo) y el dominio de II de TolA de *E. coli* (marrón), también predicha por AlphaFold. En todos los casos, se indican los residuos terminales de los modelos. Las hélices α se esquematizan con espirales y las regiones predichas como desordenadas con pioletas. Abreviaturas: A, Ala; D, Asp; N, Asn; S, Ser; K, Lys.

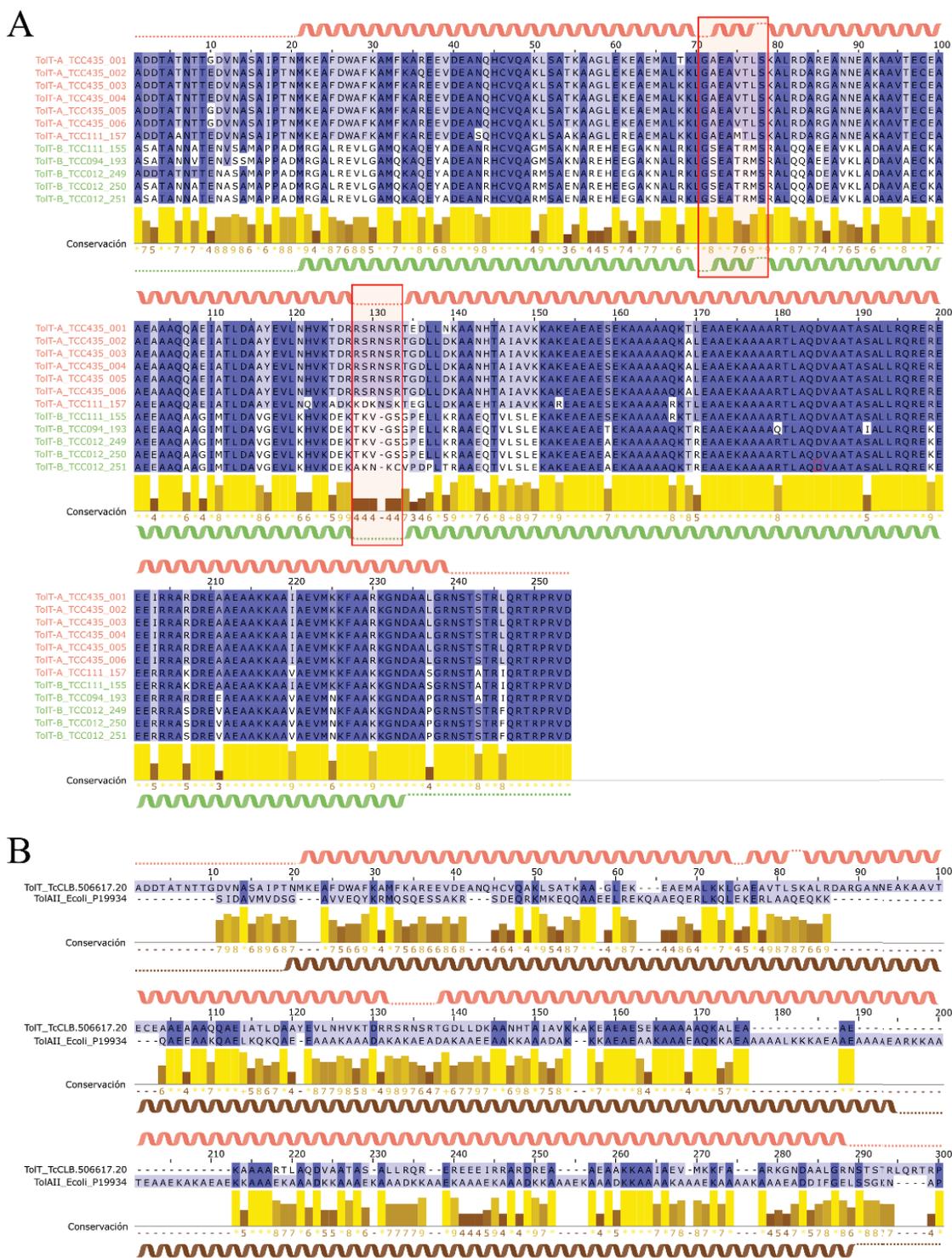


Figura R2.3: Secuencias y estructura secundarias de ToIT. Alineamiento de secuencias de aa de ToIT-A y A) -B de *T. cruzi* (cepa TCC) o B) el dominio II de ToIA de *E. coli*, coloreado según el porcentaje de identidad. Se representa en barras amarillas/marrones el grado de conservación. Las estructuras secundarias predichas se indican en rojo para ToIT-A, en verde para ToIT-B y en marrón para ToIA. Las hélices α se esquematizan con espirales y las regiones predichas como desordenadas con líneas punteadas. Los recuadros rojos en (A) indican la ubicación de los giros.

Las TolT están formadas por estructuras secundarias de tipo hélices α

Como se mostró en la sección anterior, las predicciones *in silico* indican que la estructura de las TolT está compuesta principalmente por hélices α . Para evaluar experimentalmente este punto, se generó una versión recombinante de TolT-B y se analizó mediante la técnica de dicroísmo circular lejano (CD), que permite inferir la estructura secundaria de las proteínas. Primeramente, amplificamos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) gran parte de la región madura de una proteína TolT-B (Q61-A260 de TcCLB.510433.20; Fig. R2.4A) a partir de ADN genómico (ADNg) de la cepa TCC (ver Tabla S2 con los oligonucleótidos). El amplicón fue secuenciado para verificar su identidad y clonado en el plásmido pET-28a (Fig. A1B), que provee una fusión traduccional al N-terminal con una etiqueta de 6xHis (ver detalles de clonado en Fig. A2). Este constructo fue expresado en bacterias *E. coli* y purificado por cromatografía de afinidad en una matriz de Níquel-sefarosa (Fig. R2.4B). La fracción de elución con imidazol 500 mM se dializó para eliminar aquellos contaminantes que pudieran interferir en el análisis y se concentró, obteniéndose una muestra altamente enriquecida en TolT-B (Fig. R2.4B), la cual se evaluó mediante CD. Como blanco, se empleó el *buffer* utilizado para la elución de la proteína al ser purificada, también sometido a diálisis. Al representar la elipticidad ($\text{mDeg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$) en función de la longitud de onda (nm), se evidencia una similitud entre el espectro de CD obtenido para TolT-B (Fig. R2.4C) y el obtenido para una proteína modelo compuesta mayormente por hélices α (Fig. R2.4D). A su vez, el espectro de CD de TolT-B resulta muy discordante comparado con los obtenidos para proteínas modelo compuestas mayormente por hojas β o desordenadas (Fig. R2.4D). Este hallazgo sugiere fuertemente la prevalencia de hélices α en la estructura de las TolT-B canónicas, que, dada la similitud predicha, puede hacerse extensiva a los restantes grupos de TolT.

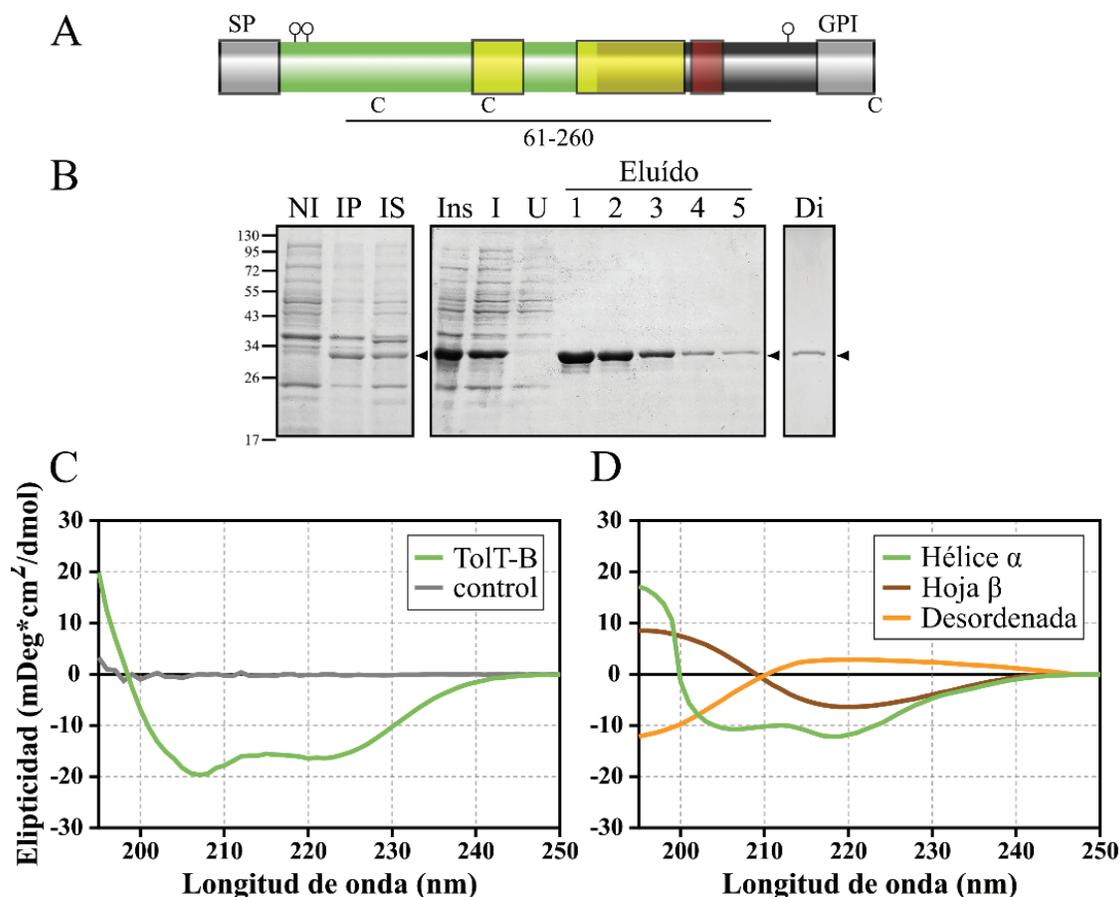


Figura R2.4: Perfil de dicroísmo circular lejano (CD) de la proteína TolT-B. A) Ilustración esquemática de una proteína TolT-B de *T. cruzi* donde se indica la región expresada de manera recombinante en *E. coli* para el análisis por CD (aa 61-260). Se señalan las secuencias predichas de SP y anclaje por GPI. B) Análisis por SDS-PAGE seguido de tinción con *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) de las fracciones de inducción (NI: no inducido, IP: inducido (*pellet*) e IS: inducido (sobrenadante)) y purificación (Ins: insoluble, I: *input*, U: *unbound* y Eluïdos 1-5) de la proteína y de la muestra final, post diálisis (Di), sometida a CD. Se señalan las Mr (en kDa) y, con una punta de flecha, la banda correspondiente a TolT-B. C) Espectro de CD en UV lejano obtenido para TolT-B. Control: *buffer* de elución. D) Espectros de CD en UV lejano de proteínas modelo altamente enriquecidas en las estructuras secundarias indicadas.

Las proteínas TolT-B forman agregados *in vivo*

A partir de los modelos generados por AlphaFold, se observó que las Cys 75 y 127 en TolT-A, y sus equivalentes en todas las proteínas TolT, se localizan una en cada una de las dos hélices α de menor longitud que forman parte de la región de la ‘cabeza’ (Figs. R2.2A y B). Al analizar las cadenas laterales de estos residuos se observa que están orientadas hacia el centro, con distancias entre sus átomos de azufre compatibles con la formación de un puente disulfuro ($\sim 2.051 \text{ \AA}$).

Para evaluar esta hipótesis de manera experimental, se evaluó si ocurre formación de agregados *in vivo*, en la superficie del parásito. Para ello, se resolvieron en paralelo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), extractos de tripomastigotes de la cepa CL Brener, con y sin el agregado del agente reductor ditioneitol (DTT) en el *buffer* de siembra, y se evaluaron mediante WB. El revelado se llevó a cabo utilizando antisueros específicos generados contra cada uno de los grupos principales de TolT (más detalle en sección 3). Como se muestra, las moléculas de TolT-B parecen ensamblarse en agregados moleculares, lo que se traduce en la aparición de especies de ~100 kDa en geles de SDS-PAGE sin DTT, mientras que para TolT-A y -C solo se observan especies monoméricas (Fig. R2.5A). Considerando la M_r aparente de los monómeros de TolT-B (~35 kDa), es probable que las especies de ~100 kDa correspondan a trímeros. Debe mencionarse, sin embargo, que este tipo de análisis no proporciona información acerca de la presencia/ausencia de moléculas adicionales (distintas a TolT) en estos agregados. TSSA (*Trypomastigote small surface antigen*), proteína bien caracterizada de la superficie de tripomastigotes de *T. cruzi*, anclada a la membrana por un GPI y sin residuos de Cys en su región madura [107,108], se utilizó como control para estos ensayos y produjo exclusivamente especies monoméricas en todas las condiciones evaluadas (Fig. R2.5A). La banda de ~100 kDa también fue revelada por un antisuero generado contra la región C-terminal común a TolT-A y -B (anti-TolT-B/A; Fig. R2.5A). Sin embargo, dado que este antisuero reconoce tanto a TolT-A (exclusivamente monomérico) como a TolT-B (principalmente contenida en agregados), la proporción entre agregados y monómeros se desplazó hacia los monómeros (Fig. R2.5A). Resultados similares se obtuvieron al extender el análisis a otras cepas de *T. cruzi* (Fig. R2.5B).

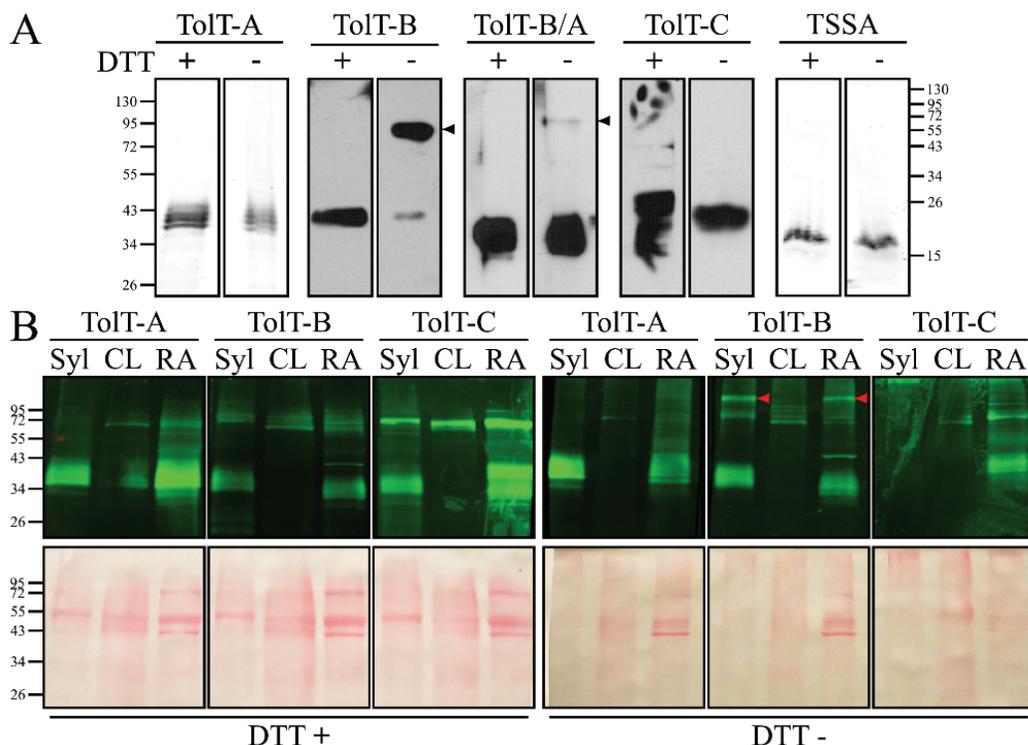


Figura R2.5: Formación de especies oligoméricas conteniendo a TolT *in vivo*. Extractos totales de tripomastigotes de las cepas A) CL Brener y B) Sylvio X10/1 (Syl), CL Brener (CL) y RA, resueltas por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (DTT +) o no reductoras (DTT -), se analizaron por WB utilizando el antisuero indicado. En los paneles inferiores de (B) se muestran las membranas teñidas con Rojo *Ponceau*. Las bandas correspondientes a posibles oligómeros (solo observados para TolT-B) se marcan con puntas de flecha. Se señalan las Mr (en kDa).

Para profundizar en la comprensión de estos agregados, se llevaron a cabo análisis en un sistema heterólogo. En primer lugar utilizamos una estrategia de tipo mapeo deletional. Brevemente, se expresaron en bacterias distintas regiones de 50 a 100 aa de TolT-B (ver detalles de clonado en Fig. A3), todas fusionadas a glutatión-S-Transferasa (GST), conteniendo sólo la Cys 71 (61–103), la Cys 123 (97–162) o ambas (61–162). Como control, se generó y expresó un constructo de tamaño similar que no contiene a ninguna de las dos Cys (155–260; Fig. R2.6A). Todas estas proteínas se purificaron a homogeneidad por cromatografía de afinidad en una matriz de glutatión-sefarosa (datos no mostrados) y se resolvieron en paralelo mediante SDS-PAGE con y sin el agregado del agente reductor DTT en el *buffer* de siembra. Luego de la tinción con CBB, se observa que, por un lado, en ausencia de DTT, la molécula que lleva ambos residuos Cys (61-162) puede ensamblarse en múltiples formas oligoméricas mientras que, por otro lado, aquella que contiene solo a la Cys 123 (97–162) produce especies monoméricas y cantidades bajas de una especie de ~70 kDa, probablemente un dímero (Fig. R2.6B). Aquella que contiene sólo a la Cys 71 (61-103), por

su parte, no dimeriza en condiciones no reductoras, así como tampoco aquella que no contiene ninguna de las Cys (155-260), utilizada como control negativo (Fig. R2.6B). La incubación *in vitro* de la variante con la Cys 123 (97–162) sola o en combinación con la que contiene a la otra Cys (61–103) produce el mismo perfil de especies de alta Mr, es decir, exclusivamente la banda de ~70 kDa que corresponde al homodímero 97-162, lo que indica que la formación de puentes disulfuro intercatenarios en bacterias es co-traduccional y no puede reconstituirse al expresar los polipéptidos en trans (Fig. R2.6B). Estos resultados sugieren que la participación de ambos residuos de Cys es requisito para obtener agregados multiméricos de TolT-B.

Para desestimar cualquier efecto del dominio GST o de la variación en tamaño y secuencia de las proteínas evaluadas en la formación de agregados, implementamos un segundo abordaje, que implicó la generación de moléculas de TolT-A y -B con mutaciones puntuales en su/s residuo/s Cys mediante PCR convencional y *splicing by overlap-extension* PCR (SOEing PCR). Todas estas moléculas tienen tamaño fijo, abarcando la región donde se encuentran ambas Cys de interés (65-169 y 59-162 de A y B, respectivamente) y están fusionadas en su extremo N-terminal a una etiqueta 6xHis (ver detalles de clonado en Fig. A4). A su vez, las moléculas evaluadas pueden tener una de las Cys reemplazada por una Ser (C75/71S o C127/123S), ambas (C75/71S y C127/123S) o ninguna (WT; Fig. R2.6C). Las distintas variantes se expresaron de manera individual y cada una de ellas se resolvió en paralelo en geles de SDS-PAGE con y sin el agregado de DTT. Los geles fueron luego transferidos a membranas y procesados por WB, revelados con un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta 6xHis. En línea con lo observado anteriormente, tanto para TolT-A como para TolT-B se observan patrones de multimerización más o menos complejos cuando ambas Cys (WT) o al menos una de ellas se encuentra presente (C75/71S o C127/123S; Fig. R2.6D), mientras que, cuando ambas Cys están ausentes (C75/71S y C127/123S), se observa solamente el monómero en el caso de TolT-A. Interesantemente, la TolT-B doble mutante (C71S-C123S) mantiene la formación de una especie que podría corresponder a un dímero (~40 kDa). Más aún, este agregado demostró ser resistente al aumento de la concentración del agente reductor, pero desaparece al agregar un agente caotrópico (urea) al *buffer* de siembra (Fig. R2.6D). En conjunto, estos hallazgos sugieren fuertemente que los residuos Cys de TolT forman enlaces disulfuro que contribuirían a estabilizar la interacción entre las hélices α y, en consecuencia, el plegamiento de las proteínas. Los resultados obtenidos con TolT-B, además, sugieren que aún en ausencia de estas Cys, las hélices α de la ‘cabeza’ establecen algún tipo de interacción no covalente, coincidente con la predicción por AlphaFold.

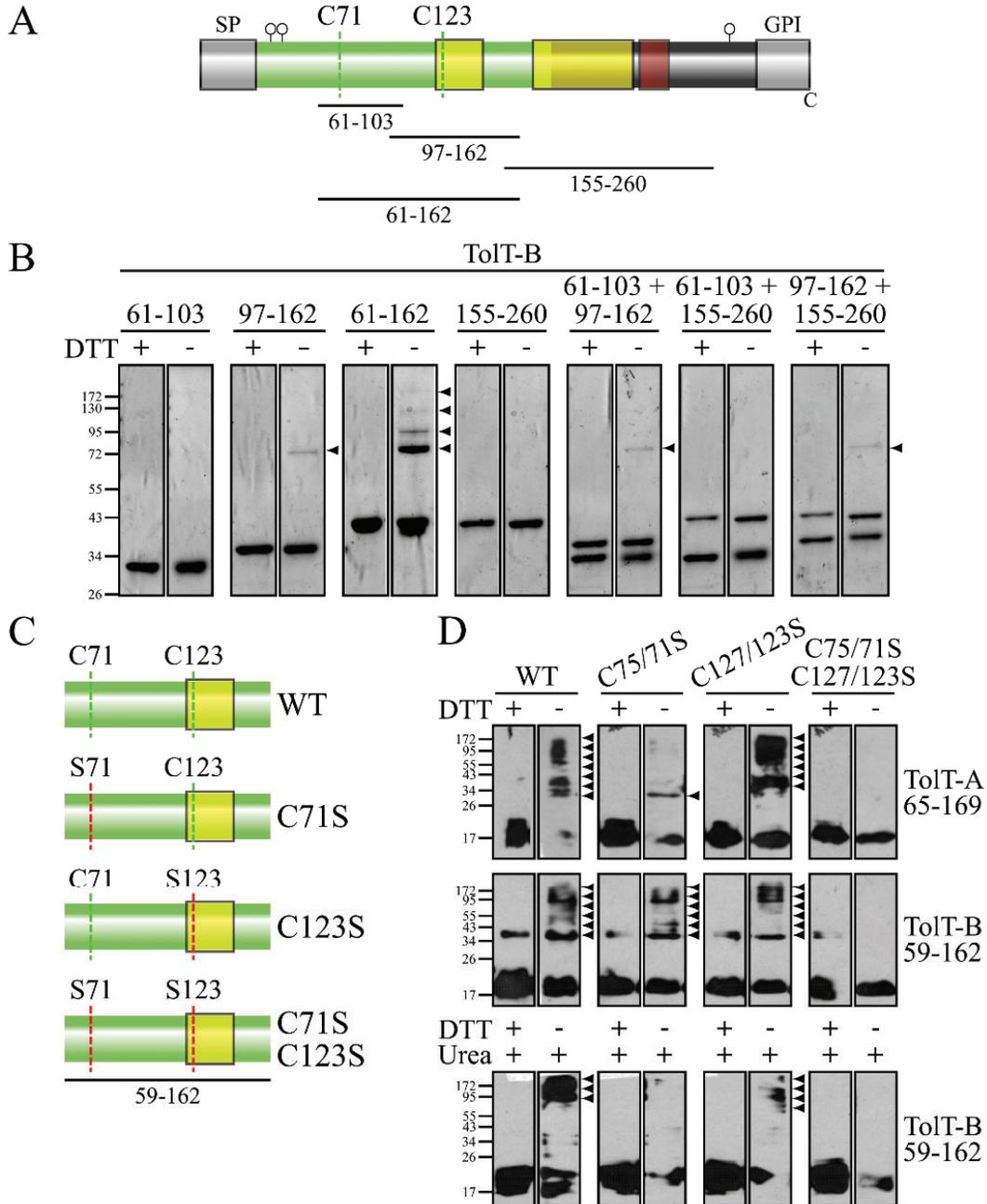


Figura R2.6: Multimerización de TolT *in vitro*. A y C) Ilustración esquemática de una proteína TolT-B completa (A) o parcial (aa 59 a 162; C) donde se indican los residuos Cys conservados (C71 y C123, en verde) y/o reemplazados (S71 y S123, en rojo). Los números indican la posición del aa a partir de la Met inicial. En (A) además se indican las regiones expresadas como fusión a GST y las secuencias predichas de SP y anclaje por GPI; mientras que en (C) se indica la región expresada como fusión a 6xHis. B y D) Muestras de las proteínas de (A) y (C) resueltas por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (DTT +) o no reductoras (DTT -) y teñidas con CBB (A) o analizadas mediante WB (D). En los paneles inferiores de (D), las muestras fueron adicionalmente tratadas con urea y procesadas de manera similar. Las puntas de flecha indican las posiciones de los oligómeros. Se señalan las Mr (en kDa).

3. Expresión de TolT durante el ciclo de vida de *T. cruzi*

Los niveles de ARNm de TolT son mayores en estadios de mamífero de *T. cruzi*

Se purificaron muestras de ARN total de los distintos estadios de *T. cruzi* y se analizó la expresión génica relativa de miembros representativos de tres grupos TolT (-A, -B y -C) mediante ensayos de transcripción reversa seguidos de amplificación de secuencias específicas por *Real-time* qPCR, utilizando los genes Calmodulina y Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *T. cruzi* como controles endógenos (ver Tabla S2 con los oligonucleótidos). Estos ensayos no pudieron realizarse para los grupos TolT-A/B y -B sin GPI debido a limitaciones en la cantidad de secuencias distintivas sobre las que elaborar oligonucleótidos específicos. Se observa que, al comparar entre estadios, la expresión de ARNm de TolT se ve significativamente disminuida en epimastigotes, particularmente para TolT-C donde resulta casi indetectable, mientras que entre estadios de mamífero (amastigotes y tripomastigotes), no se observan diferencias significativas para ninguno de los grupos analizados (Fig. R3.1). Los resultados también sugieren que los transcritos de TolT-A son los más abundantes, seguidos por TolT-B y luego por TolT-C (Fig. R3.1), aunque esta observación puede estar sesgada por el uso de diferentes oligonucleótidos para la amplificación de las distintas familias.

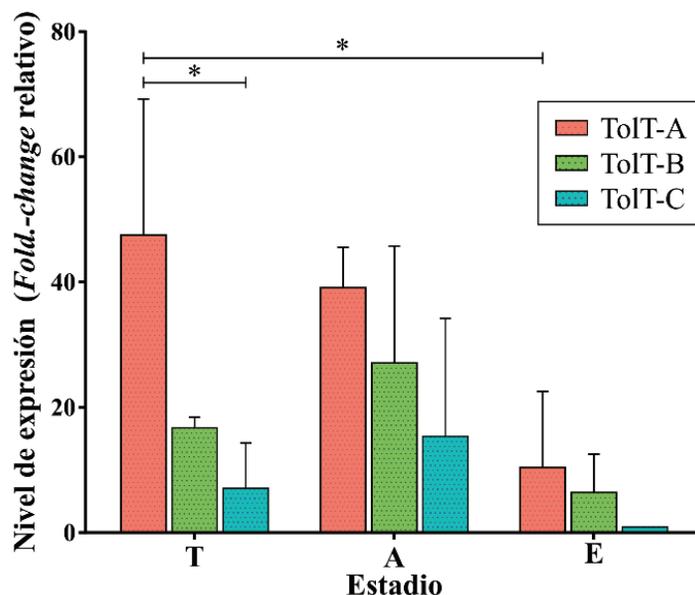


Figura R3.1: Análisis de expresión de los ARNm de TolT en *T. cruzi*. Perfil de expresión de los ARNm de diferentes grupos de TolT en los principales estadios de desarrollo de *T. cruzi* cepa CL Brener. La cuantificación se relativizó al nivel de expresión de TolT-C en epimastigotes. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las medias de la población ($p < 0.05$) evaluadas mediante la prueba de ANOVA de dos vías post corrección de Bonferroni. T: tripomastigote, A: amastigote, E: epimastigote. Adaptado de [100].

En general, las curvas de disociación resultaron en un pico único a la temperatura correspondiente para cada producto, lo que soporta la especificidad de las reacciones (Fig. MM1). Como controles adicionales de especificidad, debe mencionarse: i) que los productos de amplificación fueron secuenciados, confirmando en todos los casos su identidad (datos no mostrados), y ii) que no se observó amplificación en los controles sin templado.

La expresión de proteínas TolT se restringe a los estadios de mamífero de *T. cruzi*

Para evaluar la expresión de los productos de TolT, se produjeron antisueros en ratón y rata contra proteínas recombinantes fusionadas a GST, conteniendo regiones particulares de un miembro representativo de los distintos grupos de TolT (Tabla S1; detalle de clonado en Fig. A5). Con el objetivo de minimizar la reacción cruzada entre TolT-A y -B, el inmunógeno se limitó a la región N-terminal divergente de ambas proteínas (Fig. R3.2A). También se generaron antisueros contra una construcción de TolT-B que contiene parte de la región C-terminal común a TolT-A y que, por lo tanto, es capaz de reconocer ambas moléculas (TolT-B/A). Para TolT-C, al ser la más divergente, se generaron antisueros contra la región central. Debido a la expresión dificultosa de la proteína TolT-C recombinante en bacterias (datos no mostrados), también se generaron antisueros en ratones inmunizados con péptidos derivados de esta proteína. Por último, debe mencionarse que también se intentó generar antisueros contra el C-terminal divergente de TolT-B sin GPI, aunque sin éxito.

La especificidad de los antisueros contra las proteínas TolT-A y -B se evaluó inicialmente en ensayos de *Dot-Blot* (Fig. R3.2B). Para ello, se utilizaron fragmentos correspondientes al N-terminal diferencial de TolT-A y -B (R65-K169 y K59-L162, respectivamente) y a la región madura de TolT-B (TolT-B Full, Q61-A260). Todas estas construcciones se expresaron como fusión N-terminal a una etiqueta 6xHis (Fig. R3.2A; ver detalles de clonado en Figs. A2 y A4, según corresponda) para evitar la reacción cruzada con anticuerpos contra GST (presente en los inmunógenos). Los antisueros también fueron evaluados contra una muestra de *green fluorescent protein* (GFP) fusionada a 6xHis y expresada y purificada mediante el mismo protocolo que las TolT. Esta proteína se utilizó como control para determinar posibles reacciones inespecíficas contra la etiqueta molecular 6xHis o contra contaminantes bacterianos. Ninguno de estos antisueros, además, mostró reacción cruzada contra la proteína GST-TolT-C (datos no mostrados).

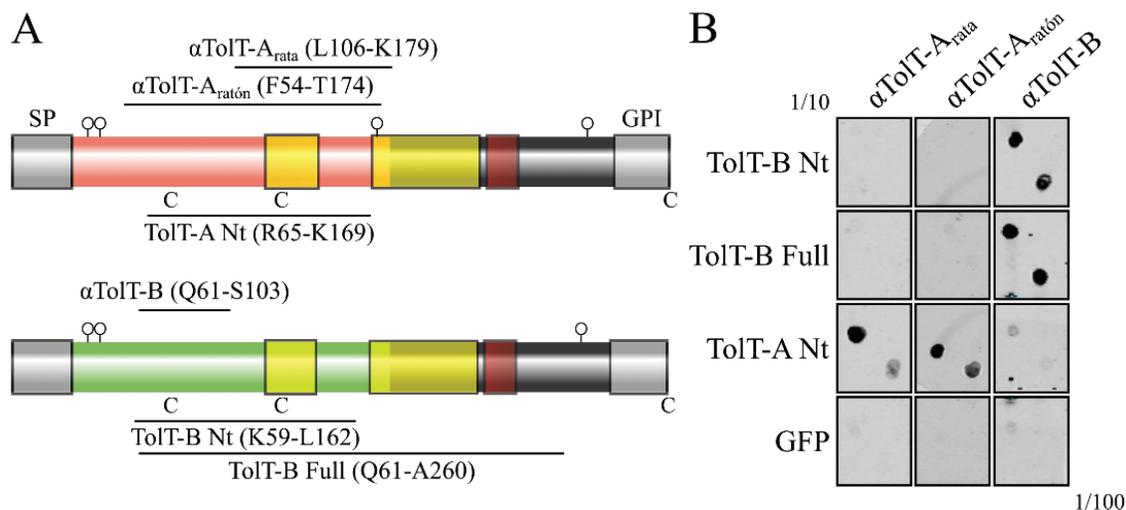


Figura R3.2: Análisis de especificidad de antiseros anti-TolT. A) Ilustración esquemática de las proteínas TolT-A y -B donde se indican los antiseros y las regiones expresadas con fusión a 6xHis utilizados en (B). Los números indican la posición aminoacídica a partir de la Met inicial. Las secuencias predichas de SP y anclaje por GPI se indican en gris. B) Proteínas fusionadas a 6xHis, en diluciones 1/10 (arriba a la izquierda) y 1/100 (abajo a la derecha) se analizaron con los antiseros indicados mediante *Dot-Blot*.

Con los antiseros generados, se llevaron a cabo ensayos de WB sobre parásitos en cada uno de los tres estadios principales de *T. cruzi*. En tripomastigotes, se visualiza la expresión de los tres grupos de TolT, mientras que en amastigotes solo se observa la expresión de TolT-A, aunque a niveles mucho menores que los detectados en tripomastigotes (Fig. R3.3A). En concordancia con lo observado para los ARNm (Fig. R3.1), no se verificó la expresión a nivel proteico de ninguna de estas variantes en epimastigotes (Fig. R3.3A). Los productos correspondientes a los tres grupos se muestran como un conjunto de bandas con el tamaño esperado (aproximadamente 30.9-37.1 kDa), lo que sugiere microheterogeneidades a nivel del procesamiento post-traduccional para miembros de un mismo grupo. También se observan diferencias en el patrón de migración electroforética entre las TolT-A de tripomastigotes y las de amastigotes (Fig. R3.3A), lo que podría atribuirse a un procesamiento post-traduccional diferencial entre estadios, bastante común en *T. cruzi* (Fig. R3.3A) [103,108].

Al analizar mediante WB algunas de las cepas de *T. cruzi* disponibles en nuestro laboratorio, se observa que, si bien en todos los casos se mantiene el patrón de bandas escalonadas, existen diferencias cuali-cuantitativas en la expresión de los distintos grupos de TolT entre las cepas, incluso entre aquellas pertenecientes a una misma DTU. Para TolT-A, por ejemplo, los patrones de Sylvio X10, Y y CL Brener son más similares entre sí y se diferencian de los de Dm28c y RA; para TolT-B y -C, en los casos donde hay marca, los

patrones son totalmente diferentes entre todas las cepas (Fig. R3.3B). Desestimando errores experimentales y/o asociados al reconocimiento de los anticuerpos, estas diferencias no muestran una correlación evidente ni con la estructura de las proteínas deducidas (para un mismo grupo de TolT, las secuencias resultan altamente homogéneas entre cepas) ni con el dosaje genético (Tabla R1.1), ambos analizados en la primera sección de esta Tesis.

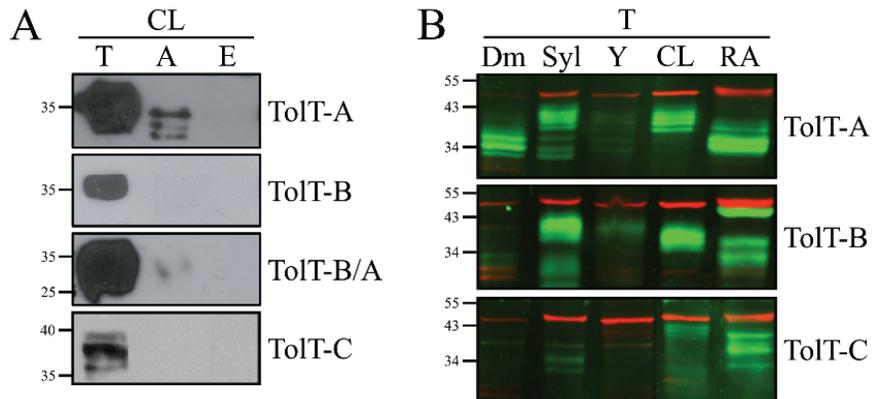


Figura R3.3: Expresión de proteínas TolT en *T. cruzi*. Extractos totales de diferentes estadios (T: tripomastigote, A: amastigote, E: epimastigote) de *T. cruzi*, cepa CL Brener (A) y de tripomastigotes de las cepas Dm28c (Dm), Sylvio X10/1 (Syl), Y C6 (Y), CL Brener (CL) y RA (B) se analizaron por WB, utilizando el antisero indicado. En (B) se utilizó como control de carga un anticuerpo anti-glutamato deshidrogenasa (GDH) de *T. cruzi*, hecho en conejo (rojo). Se señalan las Mr (en kDa). (A) adaptado de [100].

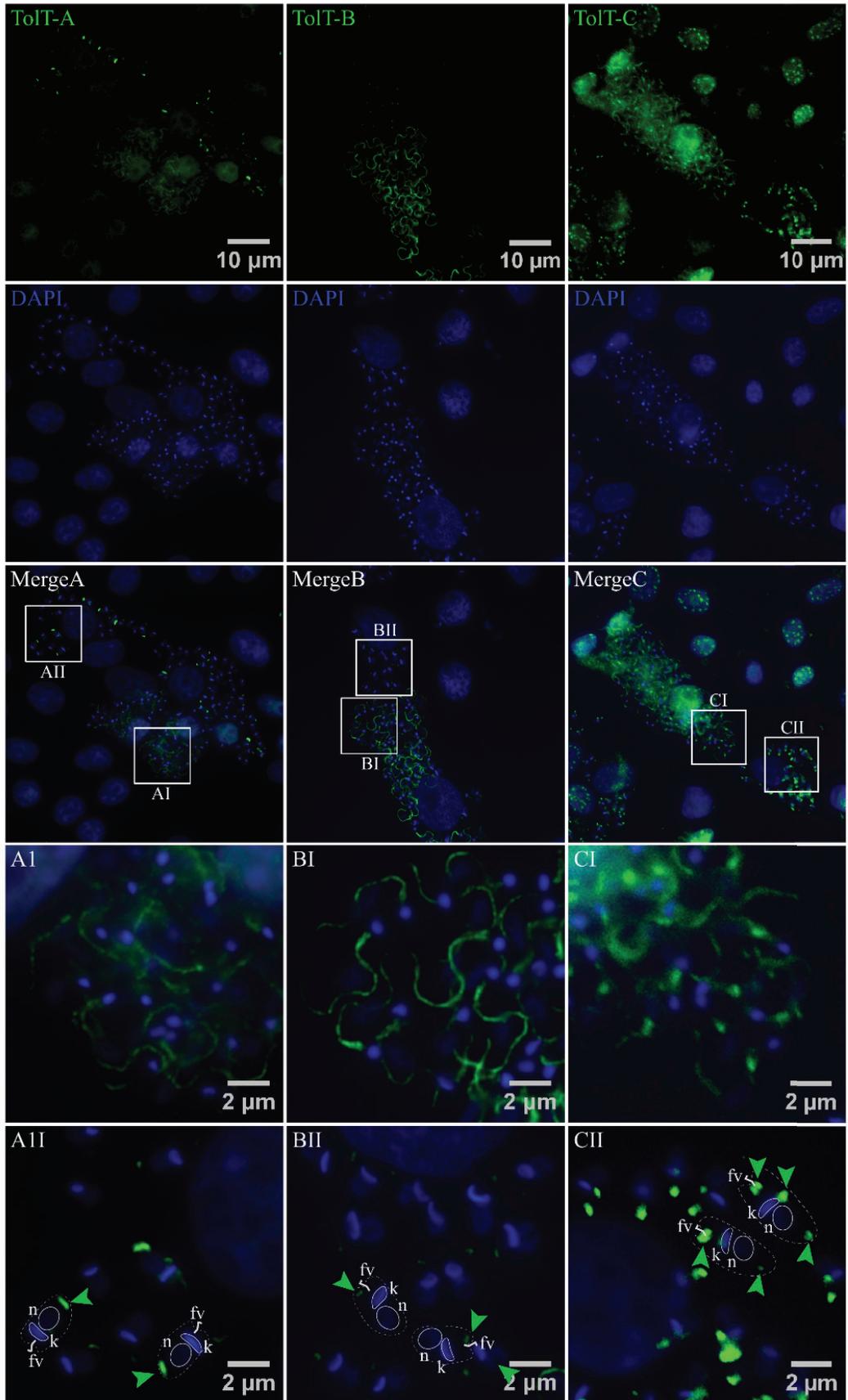
TolT se localiza en el flagelo de tripomastigotes y zonas discretas de amastigotes

Al igual que lo reportado originalmente para ‘TolT’ [75], ensayos de IFI muestran que TolT-A, -B y -C se localizan en la región del flagelo en contacto con el cuerpo del parásito en tripomastigotes extracelulares. Ensayos de infección sobre monocapas de células Vero, analizadas por IFI a distintos tiempos, permitieron verificar la misma distribución en tripomastigotes intracelulares (Figs. R3.4A y B). Sin embargo, es importante señalar que TolT-C mostró una distribución aparentemente continua, mientras que las proteínas TolT-A y -B presentaron un patrón de distribución más puntual (Figs. R3.4A y B), típico de las glicoproteínas de superficie de *T. cruzi* [102]. Imágenes de microscopía confocal respaldaron fuertemente la distribución discontinua de TolT-A y -B (Fig. R3.4C) y, aún más importante, revelaron una co-localización mínima entre sus señales (Fig. R3.4C; coeficiente de correlación de Pearson R de co-localización: -0.3). En línea con esto, ensayos de inmunoprecipitación también sugieren una mínima o nula interacción entre proteínas TolT de distintos grupos *in vivo*. Brevemente, extractos de tripomastigotes de la cepa CL Brener fueron inmunoprecipitados con un antisero anti-TolT-A (generado en rata; Tabla S1) y

analizados por WB con antisueros específicos para cada grupo de TolT (todos generados en ratón; Tabla S1). Este ensayo muestra que TolT-A es la única presente en la fracción inmunoprecipitada, mientras que TolT-B y -C solo se encuentran en las fracciones *input* y *flow-through*, indicando que, si bien se expresan de manera coordinada, las distintas TolT no interaccionan entre ellas *in vivo* (Fig. 3.4D).

Además del flagelo en tripomastigotes, algunos antisueros anti-TolT-A (pero no todos) también marcaron estructuras internas en las formas amastigotes. Más específicamente, fue marcada una región discreta hacia el extremo posterior del cuerpo del parásito, opuesta a la posición del ADNk y al sitio de emergencia del flagelo vestigial (Fig. R3.4A). Esto es consistente con los datos de WB presentados anteriormente (ver la señal en amastigotes para el antisuero anti-TolT-A; Fig. R3.3A). Los antisueros contra TolT-B y -C también marcaron regiones internas discretas en la forma amastigote en ensayos de IFI (Fig. R3.4A), que no habían sido detectadas por WB, muy probablemente debido a diferencias en la sensibilidad de ambos métodos. Contrario a TolT-A, las señales de TolT-B se acumularon hacia el polo anterior del amastigote, mientras que los productos de TolT-C lo hicieron en ambos extremos, así como también en un compartimento yuxtapuesto al ADNk, que no pudo ser identificado (Fig. R3.4A). Ningún suero mostró reactividad contra epimastigotes en IFI (datos no mostrados), en coincidencia con lo observado en ensayos de WB.

A



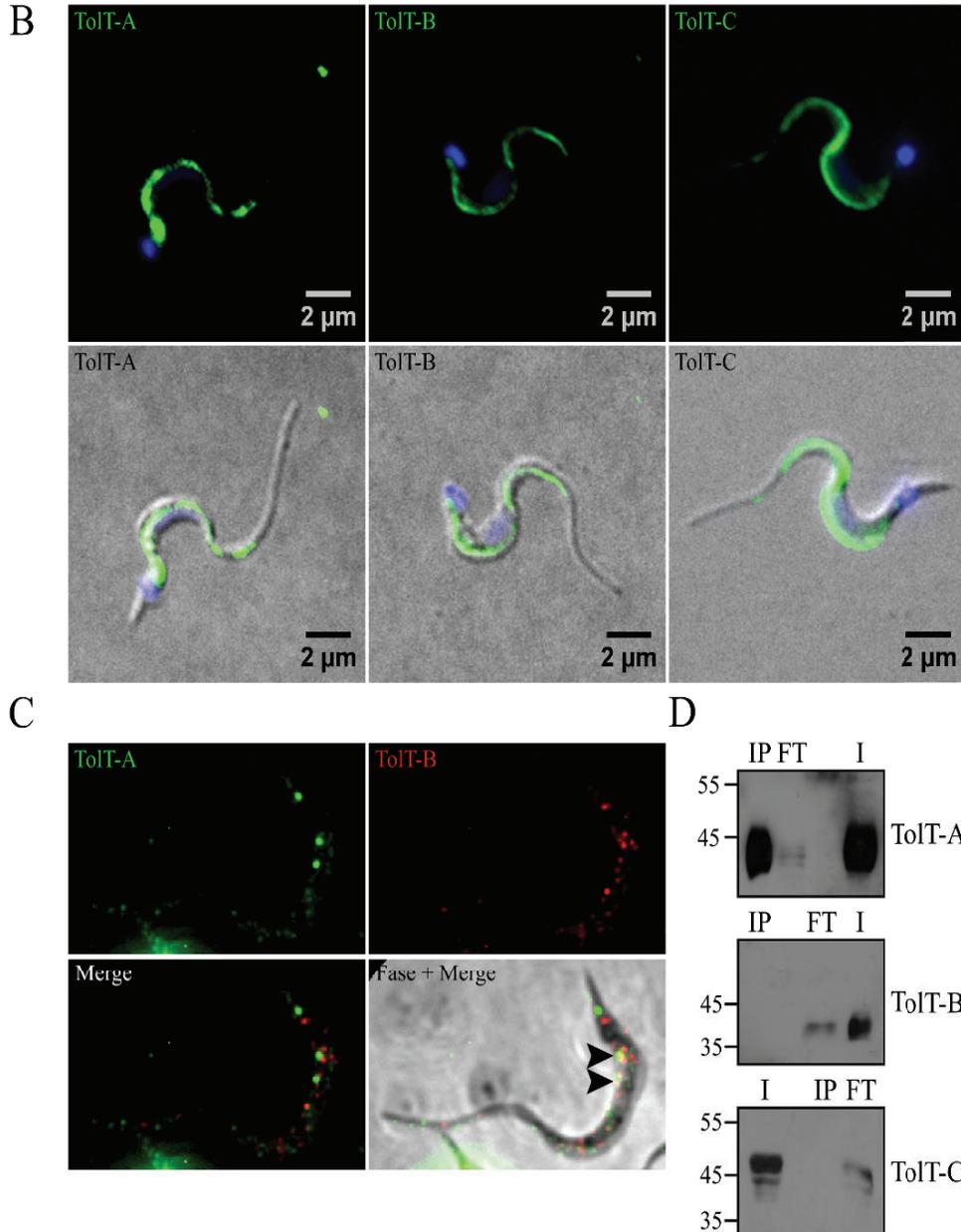


Figura R3.4: Análisis de localización de proteínas TolT en *T. cruzi*. A y B) Células HeLa infectadas con *T. cruzi* (A) o tripomastigotes purificados (B) se permeabilizaron y analizaron por IFI utilizando el antisuero indicado. Las regiones ampliadas se representan con cuadrados en las imágenes *Merge* originales. Las señales de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) se muestran en azul. En los paneles inferiores, se muestran dibujos esquemáticos de la forma amastigote en los que se indican el núcleo (n), el ADNk (k), el flagelo vestigial (fv) y, con flechas, las señales de TolT. C) Imagen confocal representativa de tripomastigotes procesados utilizando el antisuero anti-TolT-A de rata (en verde) y el antisuero anti-TolT-B de ratón (en rojo). Las puntas de flecha indican las señales que co-localizan. D) Extractos totales de tripomastigotes purificados inmunoprecipitados con el antisuero de TolT-A generado en rata. Alícuotas de las fracciones *input* (I), *flow-through* (FT) e inmunoprecipitada (IP) se analizaron por WB con el antisuero indicado (todos hechos en ratón). Se señalan las Mr (en kDa). En todos los casos se utilizó la cepa CL Brener. Adaptado de [100].

4. Caracterización bioquímica de TolT

Las proteínas TolT se encuentran asociadas, en su C-terminal, a un anclaje GPI

Para evaluar las predicciones *in silico* respecto al anclaje GPI, se trataron tripomastigotes CL Brener con fosfatidilinositol fosfolipasa tipo C (*phosphatidylinositol phospholipase C*, PI-PLC), que cliva específicamente este tipo de enlaces, y se analizaron por WB. Se observa que el tratamiento causa la desaparición casi total de las bandas correspondientes a TolT en la fracción correspondiente al *pellet* de parásitos y su aparición concomitante en la fracción sobrenadante (Fig. R4.1A). El remanente de TolT-A y -C asociado al *pellet* de parásitos luego del tratamiento con PI-PLC puede ser consecuencia de: i) la presencia de moléculas que lleven un tipo diferente de grupo acilo, ii) la presencia de moléculas inmaduras que aún no han alcanzado la superficie del parásito o iii) una digestión enzimática incompleta.

Como abordaje experimental complementario, se utilizó un protocolo para obtener una muestra enriquecida en proteínas ancladas a GPI de tripomastigotes CL Brener, aprovechando su fraccionamiento preferencial en Triton X-114 (TX-114; ver Fig. MM2 para más detalles). Alícuotas correspondientes a las diferentes fracciones fueron analizadas por WB, observándose que las especies TolT-A y -B se encontraban tanto en P1 (lisados totales de parásitos), como en P2 (que contiene principalmente moléculas asociadas a la membrana, excluidas de los microdominios ricos en GPI y esteroides) y en GPI (que contiene principalmente proteínas ancladas a GPI). En términos relativos, y desestimando posibles sesgos experimentales, TolT-B parece particionar mejor en TX-114 que TolT-A (Fig. R4.1B). Junto con los datos de PI-PLC, estos hallazgos sugieren fuertemente que las moléculas TolT (o al menos una fracción significativa de ellas) están ancladas a la membrana plasmática del tripomastigote mediante un motivo lipídico GPI. Descartando errores experimentales, la presencia de TolT-A y -C resistentes a PI-PLC (Fig. R4.1A) y las variaciones entre grupos en la relación de abundancia GPI/P2 (Fig. R4.1B) revelan cierta heterogeneidad en cómo las moléculas TolT se asocian a la superficie del parásito y sugieren que una fracción minoritaria de ellas, especialmente de los grupos TolT-A y -C, podría utilizar un grupo acilo diferente para este proceso.

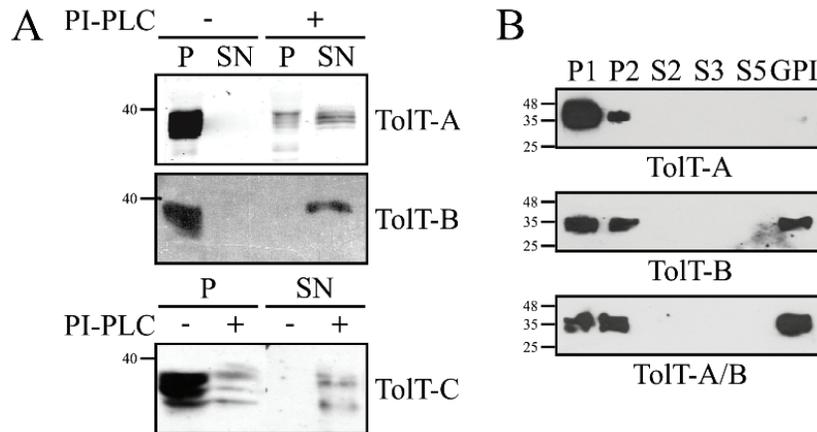


Figura R4.1: Anclaje a membrana plasmática de proteínas TolT de *T. cruzi*. A y B) Tripomastigotes de la cepa CL Brener tratados con PI-PLC de *B. cereus* (A) y fraccionados con TX-114 (B). Alícuotas del lisado total de parásitos (P) y del sobrenadante (SN), tratados (+) y sin tratar (-), así como de los distintos pasos de la purificación (P1 y P2: *pellet* 1 y 2, S2, S3 y S5: sobrenadante 2, 3 y 5 y GPI) respectivamente, se analizaron por WB con el antisuero indicado. Se señalan las Mr (en kDa). Adaptado de [100].

TolT presenta diferentes patrones de glicosilación entre cepas de *T. cruzi*

En línea con los resultados obtenidos en [75] y [78] y con las predicciones *in silico*, se analizó el perfil de N-glicosilación *in vivo* de las distintas proteínas TolT. Para ello, se realizaron ensayos de WB de lisados de tripomastigotes, tras un fraccionamiento en una matriz de sefarosa acoplada a la lectina concanavalina A (ConA). Se observó que parte de los productos de TolT-A, -B y -C se recuperaron en las fracciones unidas a ConA, indicando que al menos una fracción de ellos posee glicanos con alto contenido de manosa, particularmente con estructuras de alta-manosa o híbridas (Fig. R4.2A). En la misma línea, el tratamiento de tripomastigotes con endoglicosidasa H (endo-H) aumentó la movilidad electroforética de TolT-A y -B (Fig. R4.2B).

Dada las diferencias observadas en los patrones cuali- y cuantitativos de expresión de las proteínas TolT entre aislamientos de *T. cruzi* (Fig. R3.3B), se realizó un tratamiento con endo-H sobre tripomastigotes de distintas cepas/clones de parásitos disponibles en el laboratorio: Sylvio X10/1 (TcI), Y C6 (TcII), CL Brener (TcVI) y RA (TcVI). En todos los casos se observó una única banda de menor peso molecular en las fracciones tratadas, que contrasta con la escalera de bandas presente en las muestras sin tratar (Fig. R4.2C). Además, se observó que para TolT-A en las cepas Syl e Y hay un mejor reconocimiento por parte del antisuero sobre las formas deglicosiladas, respecto a las glicosiladas, lo que sugiere cierto ocultamiento de los epítopos debido a la presencia de los glicanos.

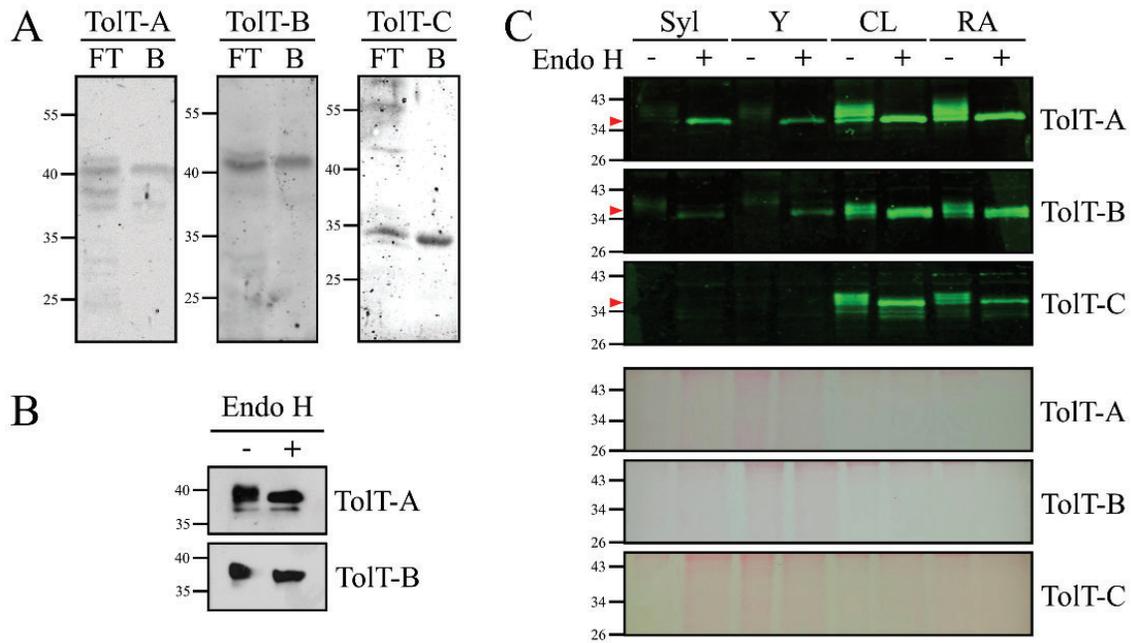


Figura R4.2: N-glicosilación de TolT de *T. cruzi*. Extractos totales de tripomastigotes de la cepa CL Brener (A y B) o Sylvio X10/1 (Syl), Y C6 (Y), CL Brener (CL) y RA, fraccionados con ConA (A) o tratados con endo H (B y C). Alícuotas de las fracciones *flow-through* (FT) y *bound* (B) y tratado (+) y sin tratar (-), respectivamente, se analizaron por WB con el antisuero indicado. En los paneles de abajo de (C) se muestran las membranas teñidas con Rojo Ponceau. Se señalan las Mr (en kDa). (A y B) adaptados de [100].

Sobre-expresión homóloga de TolT en *T. cruzi*

Para profundizar en la caracterización bioquímica de las TolT, se empleó un sistema de expresión homóloga en parásitos, previamente utilizado en el laboratorio para el análisis de distintas proteínas de *T. cruzi* [70,103,108–110]. Para ello, un representante de cada grupo fue clonado en el plásmido de expresión en *T. cruzi* pTRES-Omni (Fig. A1), con un epítipo FLAG por delante del sitio de clivaje de la secuencia consenso para la adición de GPI (Fig. R4.3). Esta disposición del FLAG en glicoproteínas de superficie de *T. cruzi* ha sido probada exitosamente [103,109], ya que, aunque requiere un clonado en dos etapas (una para la región GPI y otra para el SP-core, con un ensamblado final de la molécula completa; ver detalles de clonado en Fig. A6), previene la pérdida del mismo en la proteína madura tras el clivaje del SP y de la secuencia consenso de adición de GPI.

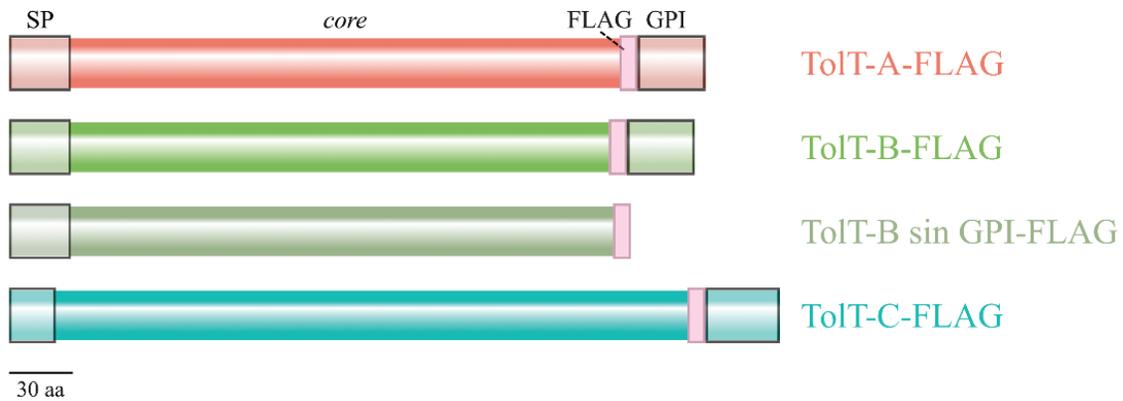


Figura R4.3: TolT con fusión a FLAG evaluados mediante estrategias de sobre-expresión homóloga. Ilustración esquemática que muestra la disposición del SP, el *core*, el GPI y la etiqueta FLAG de las distintas TolT. TolT-A: TcCLB.506617.10, TolT-B: TcCLB.510433.20, TolT-B sin GPI: TcCLB.504277.20 y TolT-C: TcCLB.504277.30.

Utilizando las construcciones pTREX-Omni TolT-FLAG y el plásmido pTREX-Omni GFP-FLAG como control, se transfectaron epimastigotes de las cepas Sylvio, Dm28c, CL Brener y RA, y se llevó a cabo la selección de los transfectantes con el antibiótico geneticina (G418). Para la cepa CL Brener, ninguna de las líneas transgénicas pudo ser seleccionada, mientras que en las demás cepas sí pudieron generarse líneas estables de epimastigotes transgénicos, que no mostraron fenotipos de crecimiento en cultivo axénico (datos no mostrados). Sin embargo, ensayos de WB revelados con un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta FLAG (Invitrogen) sobre extractos totales de parásitos indicaron que, en general, no se detecta la sobre-expresión de ninguna de las subfamilias de TolT analizadas en el estadio epimastigote, mientras que los parásitos controles, transfectados con el plásmido pTREX-Omni GFP-FLAG, muestran una correcta expresión de GFP (Fig. R4.4A). Los parásitos transfectados con la construcción TolT-B sin GPI-FLAG de la cepa Sylvio sí mostraron expresión transiente de esta proteína, que pudo ser detectada por WB con el antisuero anti-TolT-B (Fig. R4.4B). Estos parásitos, lamentablemente, nunca llegaron a establecerse en cultivo axénico.

Para diferenciar los parásitos, se incubaron monocapas de células Vero con una muestra heterogénea de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de cada línea. Tras alcanzar niveles apropiados de infección (aproximadamente 15 días), los tripomastigotes cosechados del sobrenadante se analizaron mediante WB, revelándose también con el anti-FLAG. De manera sorprendente, no se detectó sobre-expresión de TolT-A y -C en tripomastigotes de ninguna cepa, y solo se detectó la expresión de TolT-B-FLAG en la cepa RA (Fig. R4.4C y datos no mostrados). Los parásitos controles, transfectados con el plásmido pTREX-Omni GFP-FLAG, mostraron una expresión de GFP similar a la observada en

epimastigotes (Fig. R4.4C). En todos los casos, se utilizaron parásitos *wild type* (WT) como control negativo para la marcación por FLAG.

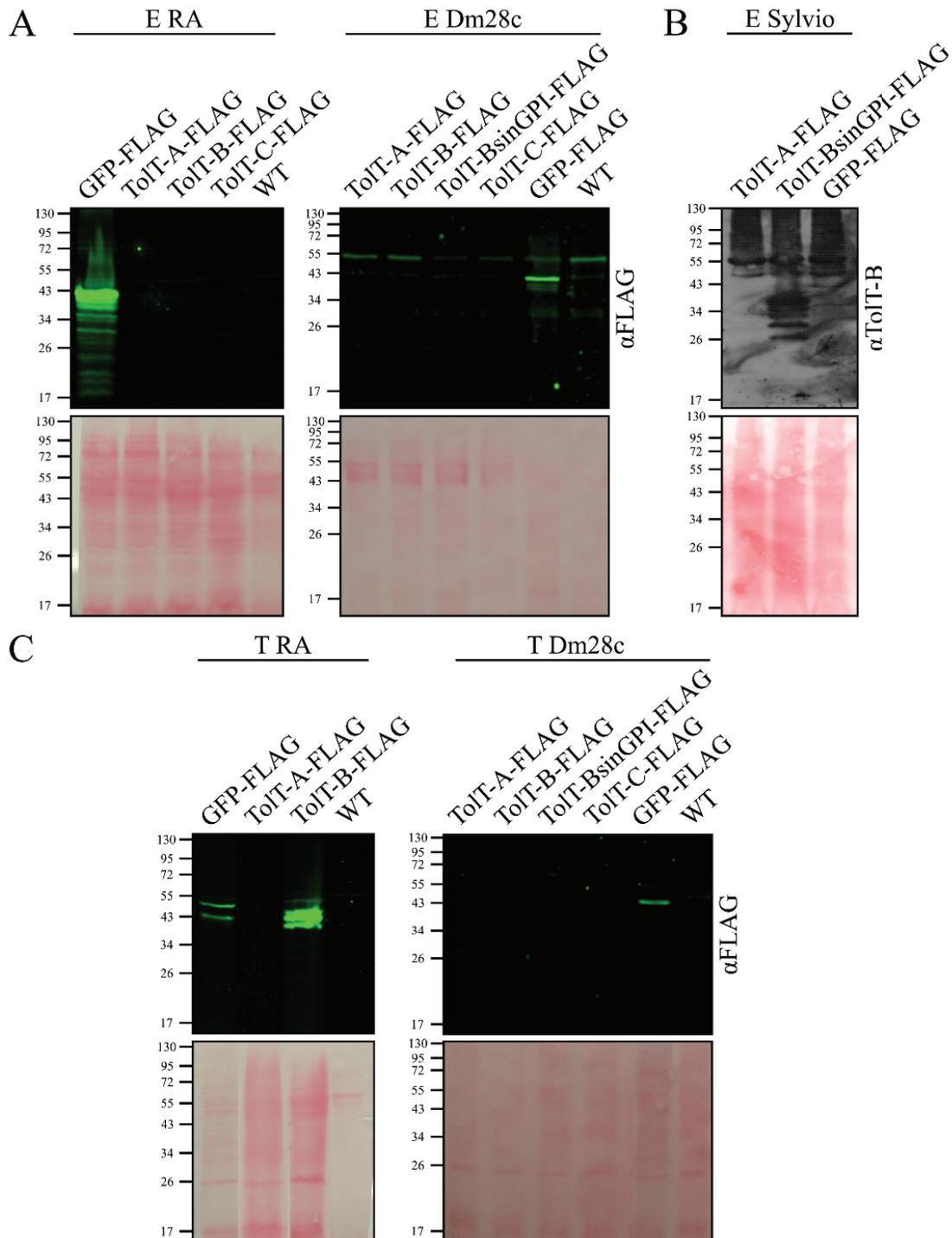


Figura R4.4: Análisis de expresión de proteínas ToIT-FLAG en *T. cruzi*. Extractos totales de parásitos transfectados con las construcciones indicadas o WT de las cepas RA, Dm28c y Sylvio (T: tripomastigote, E: epimastigote) se analizaron por WB con el anticuerpo/antisuero indicado. En los paneles inferiores se muestran las membranas teñidas con Rojo Ponceau. Se señalan las Mr (en kDa).

Posteriormente, se analizó la localización subcelular de las proteínas etiquetadas, observándose que, para aquellos casos donde no se detectó expresión por WB, tampoco se hizo por IFI (datos no mostrados). Para ToIT-B-FLAG en la cepa RA, el análisis de IFI permitió detectar la expresión en ambos estadios mayoritarios del mamífero. Por un lado, los amastigotes presentan una marca discreta hacia el extremo anterior del cuerpo del parásito, disposición idéntica a la observada para ToIT-B endógena (Fig. R4.5). Los tripomastigotes, en cambio, presentan un patrón de marca para ToIT-B-FLAG restringido al flagelo, ligeramente distinto al observado para ToIT-B endógena. Esta marca varía entre un punto en el extremo posterior (en el nacimiento del flagelo) y/o una línea punteada a la altura del núcleo y/o una línea en la zona anterior del cuerpo del parásito, justo antes de la fracción libre del flagelo (Fig. R4.5). Además, se observó que aproximadamente solo el 50-60% de los parásitos presentes en el campo visual tenían marca.

Una observación relevante fue que, además de la dificultad para obtener tripomastigotes (aún utilizando medios definidos que promueven la generación de metacíclicos como el M16 [111]), la prevalencia de parásitos sobre-expresantes decaía rápidamente en el tiempo, hasta volverse indetectables en aproximadamente 1-2 meses. Ensayos de WB muestran que para parásitos ToIT-C-FLAG cosechados del sobrenadante de células Vero infectadas no se observa la expresión de las ToIT endógenas ni de la proteína TSSA II, dos marcadores distintivos de la forma tripomastigote [103] (Fig. R4.6A). Más aún, en estos parásitos (y en los ToIT-A-FLAG, que también muestran una menor expresión de TSSA II) se detecta la expresión de TcSMUG L, un marcador de formas epimastigotes [109] (Fig. R4.6A), indicando que esta población está compuesta por estadios diversos, probablemente intermedios entre epimastigotes y tripomastigotes.

Es importante mencionar que, una vez lograda la infección celular, los parásitos ToIT-B sobre-expresantes no mostraron ningún fenotipo diferencial en cuanto a su invasividad, replicación intracelular y motilidad (no mostrados). Estos datos, sin embargo, corresponden solo a observaciones no parametrizadas, realizadas durante los conteos y repiques de los parásitos. Ensayos preliminares indican que ToIT-B-FLAG, a diferencia de la ToIT-B endógena (Fig. R2.5), no forma agregados en la superficie del parásito en ausencia del agente reductor DTT en el *buffer* de siembra (Fig. R4.6B).

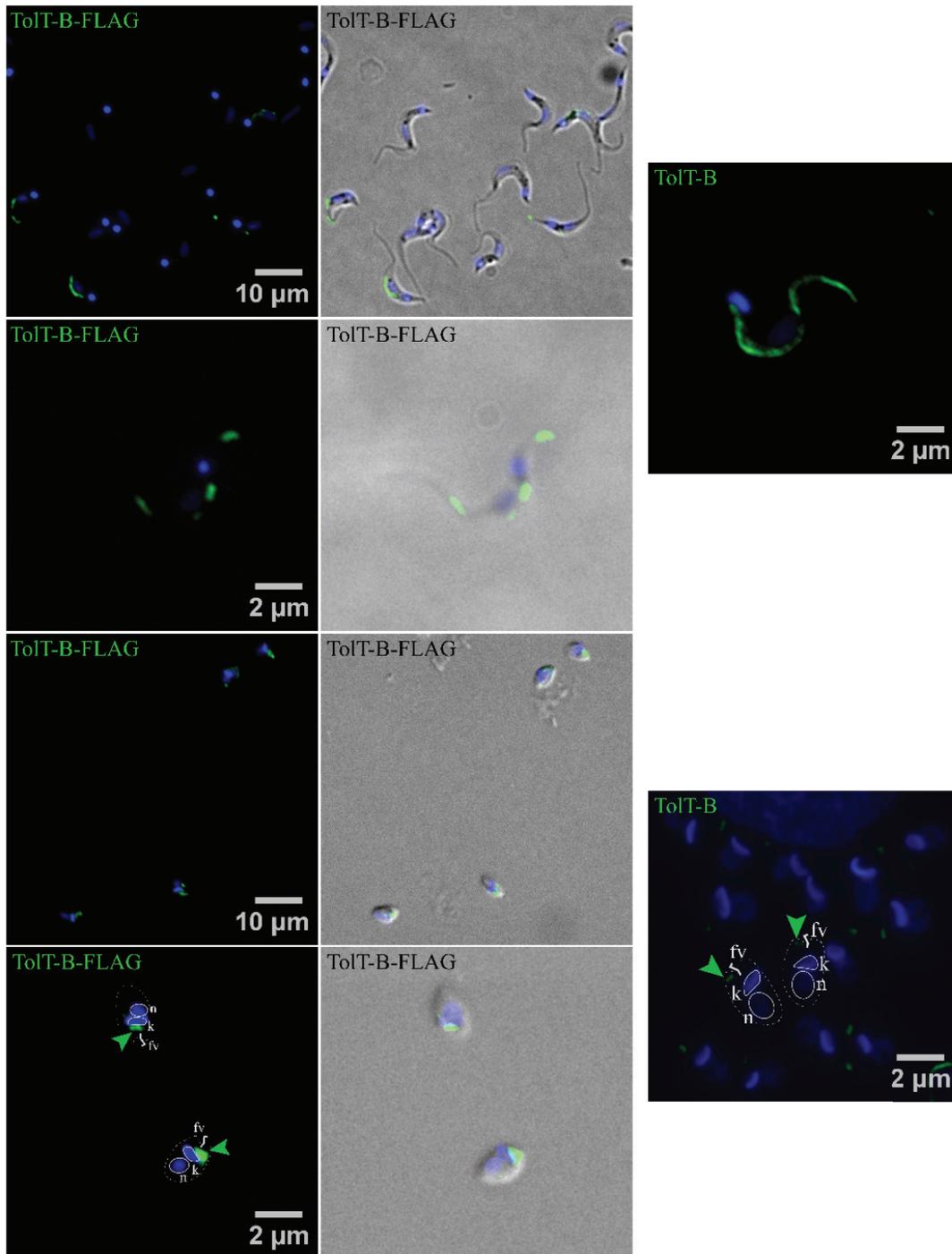


Figura R4.5: Análisis de localización de proteínas TolT-FLAG en *T. cruzi*. Tripomastigotes extracelulares y amastigotes sobre-expresantes de TolT-B-FLAG permeabilizados y analizados por IFI utilizando el anticuerpo anti-FLAG (Invitrogen). Las señales de DAPI se muestran en azul. Dibujos esquemáticos de la forma amastigote indican el núcleo (n), el ADNk (k), el flagelo vestigial (fv) y, con flechas, las señales de TolT. En los paneles de la derecha se muestra, como referencia y a fines comparativos, la expresión de TolT-B endógena en tripomastigotes (arriba) y amastigotes (abajo) WT.

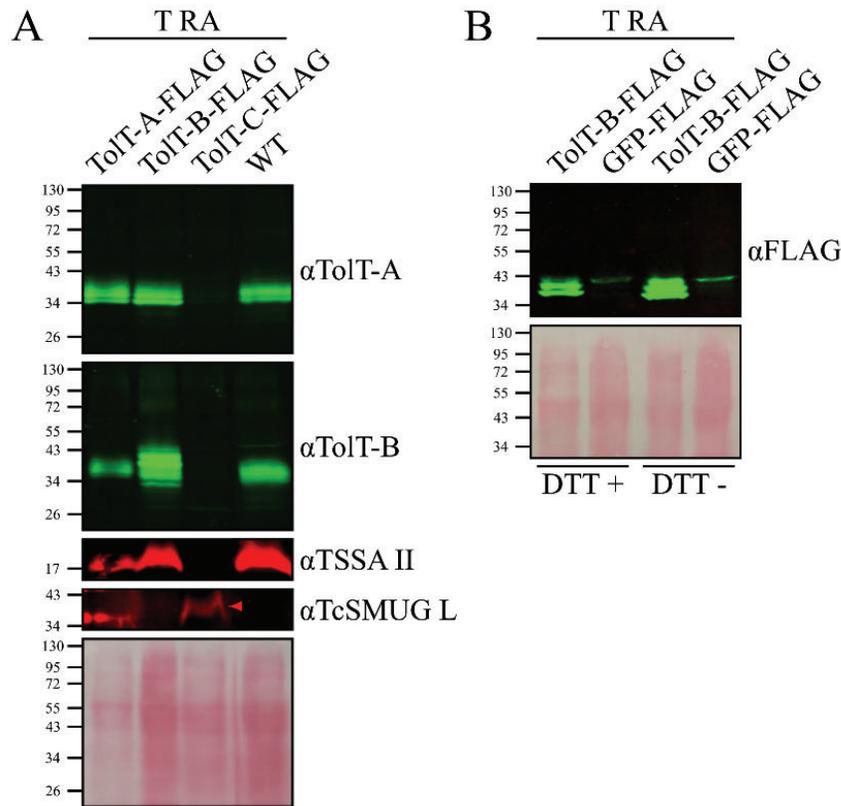


Figura R4.6: Caracterización de proteínas TolT-FLAG en *T. cruzi*. Extractos totales de parásitos transfectados con las construcciones indicadas o WT de las cepas RA (A) sin tratamiento o (B) resueltos por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras (DTT +) o no reductoras (DTT -) se analizaron por WB con el anticuerpo/antisuero indicado. En los paneles inferiores se muestran las membranas teñidas con Rojo *Ponceau*. Se señalan las Mr (en kDa).

También resultó llamativo que, si bien el plásmido utilizado provee secuencias regulatorias correspondientes a los genes TcP2 β (HX1) y GAPDH de *T. cruzi*, que permiten la expresión ubicua (en todos los estadios del parásito) de las proteínas recombinantes, no se observó sobre-expresión de las TolT-FLAG en el estadio de epimastigote; a diferencia de lo reportado para otras proteínas [108]. Esto podría deberse a que la expresión de TolT requiera de alguna característica estadio-específica (presente en tripomastigotes pero ausente en el estadio de epimastigote), entre las que podemos hipotetizar: i) la interacción con ciertos factores regulatorios que estabilice a los ARNm, potencien su traducción o faciliten su transporte; ii) algún factor requerido por la maquinaria celular para el correcto procesamiento, plegamiento o estabilidad de las proteínas; iii) ciertas diferencias en el metabolismo celular (disponibilidad de nutrientes, cofactores, o condiciones redox) que podrían influir en la eficiencia de la transcripción y traducción del ARNm de TolT, específicamente.

5. Identificación, mapeo y validación de epítomos en TolT

El reconocimiento por anticuerpos se dirige al C-terminal maduro de TolT

Ensayos previos realizados en otros laboratorios sugirieron la presencia de epítomos B en algunas proteínas TolT [78], que son reconocidos por anticuerpos específicos durante la infección con *T. cruzi* en humanos y perros [81]. La caracterización serológica exhaustiva de estos potenciales reactivos serodiagnósticos, sin embargo, todavía estaba pendiente al inicio de esta Tesis. Con el objetivo de llevar a cabo un mapeo fino de su estructura antigénica, y en el marco de un proyecto de identificación y mapeo a escala genómica de antígenos de *T. cruzi* [112,113], se analizaron en primer lugar 3 secuencias TolT-A (TcCLB.506617.10, TcCLB.504157.130 y TcCLB.508767.20), 2 TolT-B (TcCLB.510433.20 y TcCLB.504277.11), 1 TolT-B sin GPI (TcCLB.504277.20) y 1 TolT-C (TcCLB.504277.30) utilizando microarreglos de péptidos de alta densidad [112]. El mismo tipo de aproximación experimental y análisis de datos fue utilizado para mapear a escala global la reactividad serológica de la familia de las MASPs de *T. cruzi* [114].

Brevemente, se analizaron péptidos de 15 aa de longitud, con una superposición de 14 aa, que en conjunto cubrían la totalidad de cada una de las secuencias. Además de proveer una máxima resolución, este extensivo solapamiento permite tomar las señales de los péptidos consecutivos como pseudorélicas. Los arreglos se procesaron, primero, con inmunoglobulina G (IgG) humana normal para evaluar la reactividad de fondo, luego con IgG purificada de pacientes con Enfermedad de Chagas y los perfiles antigénicos finales se calcularon mediante sustracción de las señales [112]. Los productos TolT mostraron, en general, una reactividad muy baja en este primer abordaje. Sólo TcCLB.508767.20 (TolT-A), TcCLB.504277.11 (TolT-B canónica) y TcCLB.504277.30 (TolT-C) fueron designados como ‘antígenos débiles’ en el contexto de todo el conjunto de proteínas evaluadas (Fig. R5.1A). Además, cada uno de ellos mostró solo un ‘pico antigénico’, es decir, una serie de péptidos consecutivos que generan reactividad por encima del umbral de corte establecido (Fig. R5.1A). Los picos antigénicos de TolT-A y -B abarcan la misma secuencia, ^{266/261}*(S/P)GRNSTATRIQRTRPRVDGGGIPL, localizada en su región C-terminal madura y fueron reconocidos solo por uno de los cuatro grupos de sueros humanos ensayados (grupo D), mientras que el pico de TolT-C abarca la secuencia ¹⁴²AEKAAVDADTAALAALLEVLQHSK y fue reconocido por dos de ellos (grupos C y D, Fig. R5.1A). La anotación de TcCLB.504277.11 está truncada en su extremo N-terminal, por lo que su gráfica no presenta señal en los primeros 100 aa. La posición de sus picos se

acompaña por un asterisco (*) dado que se estima a partir de la Met inicial esperada, basada en secuencias TolT-B completas.

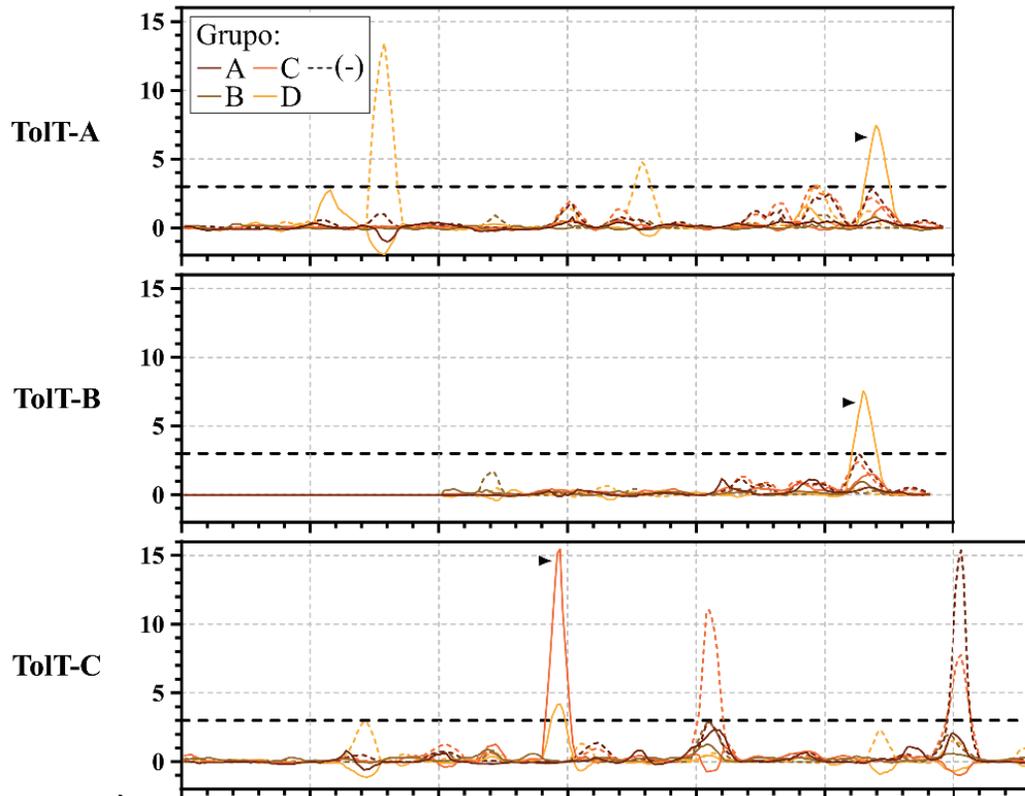
En un segundo set de microarreglos, más amplio y actualizado, se incluyeron 7 secuencias TolT-A (TcCLB.506617.5, TcCLB.506617.10, TcCLB.506617.20, TcCLB.504157.130, TcCLB.508767.20, TCSYLVIO_000403 y TCSYLVIO_009289), 5 TolT-B canónicas (TcCLB.508767.10, TcCLB.510433.20, TcCLB.504277.11, TCSYLVIO_004011 y TCSYLVIO_004012), 2 TolT-B sin GPI (TcCLB.504277.20 y TCSYLVIO_004013) y 2 TolT-C (TcCLB.504277.30 y TCSYLVIO_004014) [113]. En este caso, se abordaron dos estrategias. La primera, orientada a descubrir antígenos y mapear epítomos, consistió en descomponer las proteínas en péptidos de 16 residuos superpuestos con un desplazamiento de 4 aa y ensayarlas con muestras de IgG de diferentes grupos de sueros provenientes de personas con Enfermedad de Chagas crónica de distintos países: Argentina (AR), Bolivia (BO), Brasil (BR), Colombia (CO), México (MX) y Estados Unidos (US). La segunda estrategia, orientada a aumentar la resolución del mapeo y estimar la prevalencia poblacional de los antígenos, utilizó péptidos de 16 residuos superpuestos con un desplazamiento de 1 aa, que se ensayaron con muestras de IgG obtenidas de sueros individuales, provenientes de estas mismas regiones.

Esta vez, los productos TolT mostraron una mejor reactividad, definiéndose regiones antigénicas en TcCLB.506617.10, TcCLB.506617.20, TcCLB.504157.130, TcCLB.508767.20, TCSYLVIO_009289 (TolT-A), TcCLB.508767.10, TcCLB.510433.20, TcCLB.504277.11, TCSYLVIO_004011, TCSYLVIO_004012 (TolT-B), TcCLB.504277.20 (TolT-B sin GPI), TcCLB.504277.30 y TCSYLVIO_004014 (TolT-C). Si bien, a modo ilustrativo, solo se muestran los resultados de aquellas secuencias positivas para el primer microarreglo (Fig. R5.1A), en términos generales se observa que las secuencias de TolT-A y -B poseen, con algunas variaciones, una región antigénica (A3/B3) hacia su C-terminal, que coincide muy bien con la secuencia antes descrita: ²⁶⁵ASGRNSTATRIQRTRPRVDGGGIPLLLR y ^{263*}RNSTATRIQRTRPRVDGGGIPLLLRAP, respectivamente, y que es reconocida por sueros de todos los países. Además, ambas comparten un pico (A1/B2), reconocido solo por sueros de US: ¹⁸⁵EAESEKAAAAARKTLEAAEK y ¹⁷⁸EAEAEOTEKAAAAAQTREAA, respectivamente (Fig. R5.1B). TolT-A también presenta un pico (A2), en general más pequeño y reconocido por sueros de MX y US, sobre la secuencia: ²⁴⁵KKAAIAEVMKKFAAKK, mientras que TolT-B presenta un pico propio (B1), reconocido por sueros de AR y CO, sobre la secuencia:

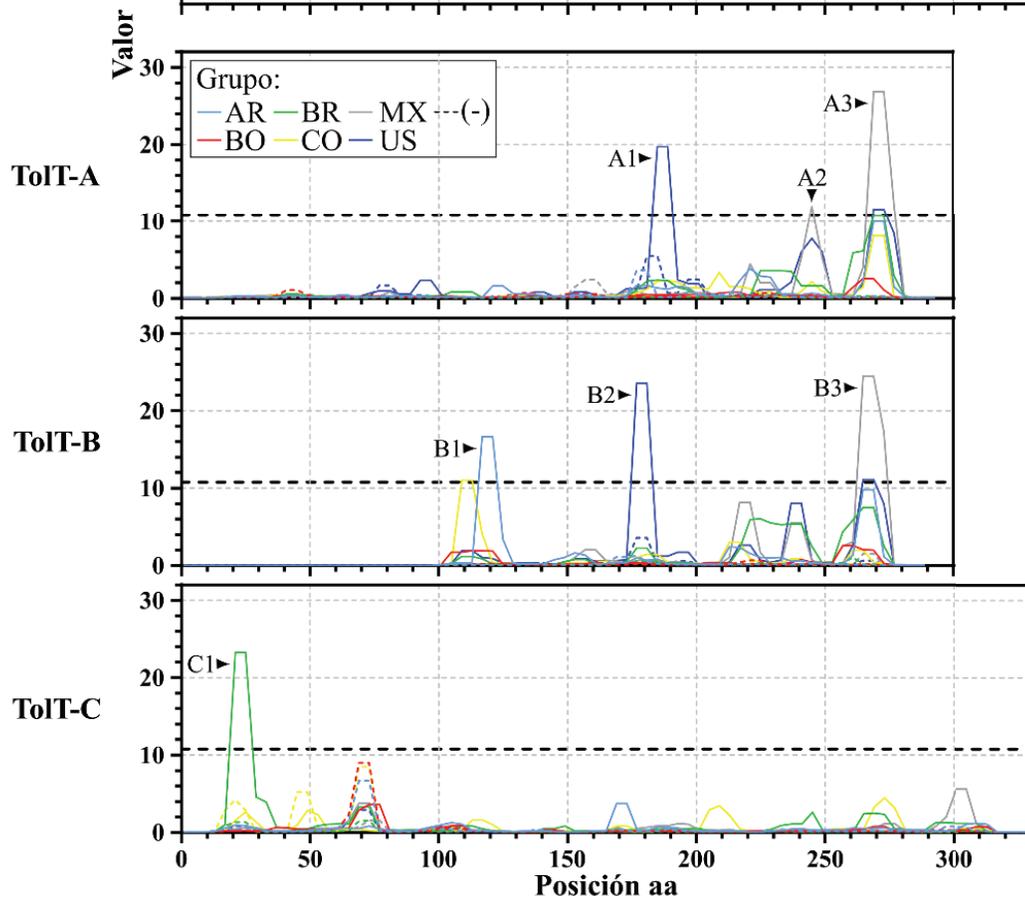
¹¹⁰EEAVKLADAAVAECKAAEEAAQAAGIMT (Fig. R5.1B). TolT-C, en cambio, muestra resultados que difieren completamente con lo observado previamente. Por un lado, en la secuencia de CL Brener muestra un único pico en su N-terminal (C1), reconocido por sueros de BR: ²¹GANSPEKEAATPRKAEGGQP (Fig. R5.1B), mientras que, por el otro, en la secuencia de Sylvio, presenta un pico hacia su C-terminal (C2), reconocido por sueros de todos los países: ²⁶⁹EAEKALNRAAAADKRVAELELARQKQSKEQNEGRGHRRV (datos no mostrados). TolT-B sin GPI, por último, no presentó un reconocimiento consistente por los sueros de los distintos países, identificándose en ella dos picos: ¹¹³AEEAVKLADAAVAECKAAEEAAQA (BsinGPI1), similar al pico B1 (ver arriba), y ²²⁵REKEEERRRARDREEAYVGN (BsinGPI2), reconocidos por sueros de CO y MX, respectivamente (datos no mostrados).

Para los análisis con sueros individuales, solo se abarcan aquellas regiones antigénicas definidas con el primer diseño (péptidos que fueron reactivos con al menos una muestra positiva para Enfermedad de Chagas y que no mostraron señal en muestras de personas sin Enfermedad de Chagas), extendiéndose 16 aa a cada lado. Para TolT-A se consideraron las regiones comprendidas entre los aa 169-220 (A1) y 253-308 (A3); para TolT-B las comprendidas entre 102-153 (B1), 162-213 (B2) y 250-305 (B3); y para TolT-C la comprendida entre 5-56 (C1). A1 y B2 presentan una seroprevalencia de 4.23% y 7.04%, siendo la primera reconocida por 1 suero de AR, BO y US y la segunda por 2 sueros de BR y 3 de US. A3 y B3, por su parte, presentan una seroprevalencia del 29.58% y son reconocidas por un número variable de sueros de todos los países (entre 1 y 9; los mismos, con alguna excepción). B1, con una seroprevalencia de 4.23%, es reconocida solo por 1 suero de AR, CO y MX y C1, con una seroprevalencia de 18.31%, es reconocida por un número variable de sueros (entre 1 y 6) de BO, BR, CO, MX y US (Fig. R5.1C). Interesantemente, la región incluida para la TolT-C de Sylvio, comprendida entre los aa 253-324 (C2), presenta una seroprevalencia del 88.73% y es reconocida por entre 9 y 12 sueros de todos los países, sugiriendo que podría constituir un buen marcador serológico para infecciones con *T. cruzi* (datos no mostrados). Las regiones correspondientes a TolT-B sin GPI, entre los aa 97-152 (BsinGPI1) y 209-260 (BsinGPI2), presentaron seroprevalencias de 4.23% y 2.82%, con reconocimiento por parte de 1 suero de AR, CO y MX, y 1 suero de CO y MX, respectivamente (datos no mostrados).

A



B



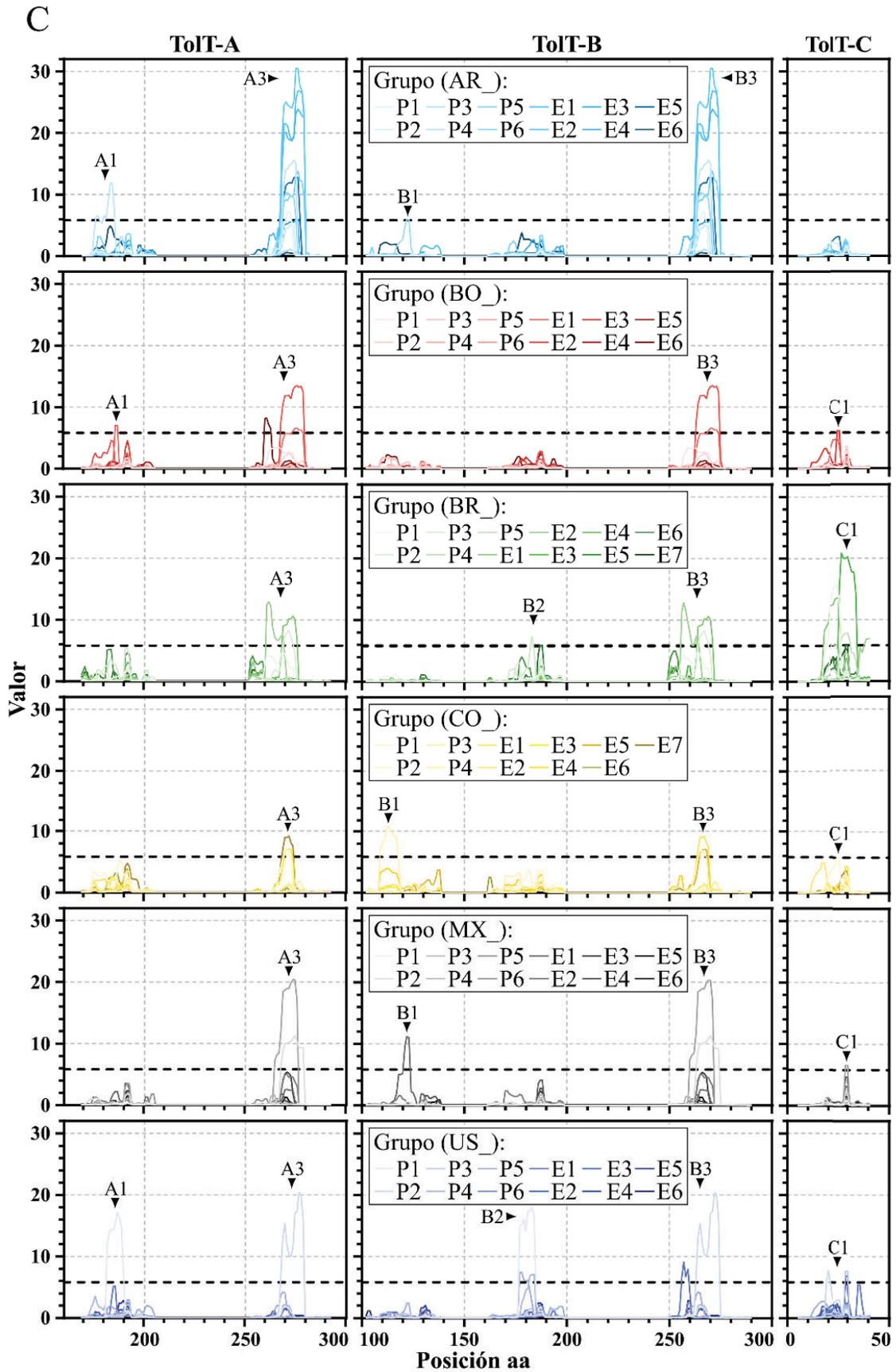


Figura R5.1: Análisis de epítomos B lineales de TolT mediante microarreglos. Microarreglos compuestos por péptidos de 15 (A) o 16 aa (B y C), con superposición de 14 (A), 12 (B) o 15 (C) residuos; abarcando el producto TolT indicado, sondeados, en duplicado, con muestras de IgG purificadas. A) Sondeo con 8 grupos de sueros (A, B, C y D), 4 con Enfermedad de Chagas crónica y 4 negativos para la misma (-). Punto de corte: 3.0. B) Sondeo con 12 grupos de sueros provenientes de distintos países (AR: Argentina, BO: Bolivia, BR: Brasil, CO: Colombia, MX: México y US: Estados Unidos), 6 con Enfermedad de Chagas crónica y 6 negativos para la misma (-). Punto de corte: 10.78 (moda + 4 desvíos estándar, DE). C) Sondeo con 11-12 sueros individuales provenientes de distintos países (P y E: sueros incluidos y no incluidos en los *pools* de cada país, respectivamente). Punto de corte: 5.81 (moda + 2.4 DE). Se indica la reactividad media de cada muestra de IgG hacia cada péptido (en unidades arbitrarias de fluorescencia) frente a la posición de los aa (tomando como 1 a la Met inicial predicha esperada). Se señalan las regiones antigénicas definidas. Los puntos de corte se indican con líneas punteadas en negro.

Estos resultados indican que TolT presenta zonas antigénicas, conteniendo epítomos B-lineales, de su centro hacia su extremo C-terminal. Además, puede inferirse que a) ninguna de estas regiones antigénicas muestra una gran prevalencia y b) que algunas de ellas muestran polimorfismos entre DTUs (Fig. S4), por lo que podrían constituir candidatos para esquemas de serotipificación [53]. Estos resultados son compatibles con la identificación de respuestas inmunes muy diversas en personas con Enfermedad de Chagas [113].

El perfil antigénico de TolT fue también evaluado utilizando proteínas recombinantes. Para esto, se utilizaron una serie de construcciones con fusión a GST previamente generadas (ver detalles de clonado en Figs. A3 y A5, según corresponda), denominadas en esta sección: A Nt (N-terminal de TolT-A, F54-T174), TolT-B Nt (N-terminal de TolT-B, Q61-L162), B/A Ct (C-terminal de TolT-B común a TolT-A, G155-A260) y C (región madura de TolT-C, A83-S313). Estas moléculas se utilizaron en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar anticuerpos específicos en muestras de sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas crónico provenientes de Argentina, sin daño patológico. Mediante este procedimiento, se observa la detección de anticuerpos específicos de TolT en una fracción de los sueros positivos y en ninguno de los 19 sueros de individuos sanos (Fig. R5.2A). Estos anticuerpos están dirigidos a la región C-terminal conservada entre TolT-A y -B. Debido a problemas de expresión en bacterias, la secuencia ²⁶³*RNSTATRIQRTRPRVDGGGIPLLLRAP (A3/B3), destacada en ambas pruebas de microarreglos (Fig. R5.1), no se incluyó en la proteína B/A Ct, indicando que la reactividad observada resulta de la presencia del epítomo B2 identificado en los microarreglos, que se extiende entre los aa 162 y 213. Además de la proteína B/A Ct, solo una muestra reaccionó contra la región N-terminal de TolT-A y dos muestras contra TolT-C (Fig. R5.2A). Respecto

de esta última proteína, debe mencionarse que la región comprendida entre los aa 253-324 (C2), la más reactiva para TolT-C según los microarreglos peptídicos (detectada sobre la secuencia de Sylvio), fue incluida solo parcialmente en la versión recombinante fusionada a GST. Además, esta última, refleja la secuencia correspondiente a CL Brener. Todas estas consideraciones pueden haber afectado negativamente el reconocimiento serológico de C en ELISA.

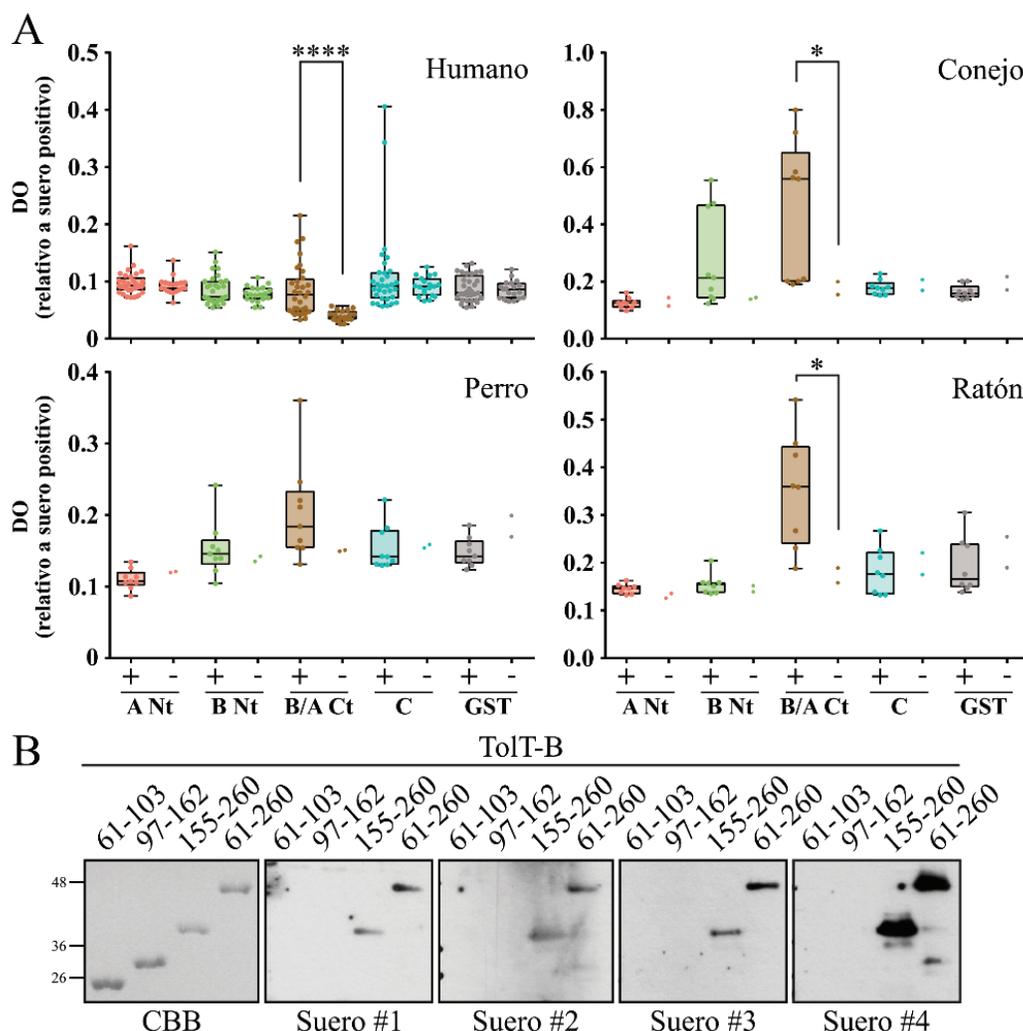


Figura R5.2: Análisis de epítomos B de TolT mediante WB y ELISA. A) Diferentes proteínas TolT de fusión a GST: TolT-A F54-T174 (A Nt), TolT-B Q61-L162 (B Nt), TolT-B G155-A260 (B/A Ct), TolT-C A83-S313 (C) y GST fueron ensayadas por ELISA. Las placas se recubrieron con el antígeno indicado y se incubaron con 31 muestras de suero de individuos con Enfermedad de Chagas crónico (+) o 19 de individuos no infectados (-). Además se analizaron sueros positivos de conejos (n = 9), perros (n = 9) y ratones (n = 8) junto con 2 negativos de cada especie. La mediana y el DE de cada grupo se indican mediante cajas y barras. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las medianas de las poblaciones (****: $P < 0.0001$, *: $P < 0.05$, *Test* de Mann-Whitney). B) Las proteínas TolT-B de fusión a GST indicadas se sometieron a tinción con CBB o se analizaron mediante WB con 4 sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas crónico.

Ensayos de WB sobre una serie de mutantes por delección de TolT-B (proteínas recombinantes fusionadas a GST; ver detalles de clonado en Figs. A2 y A3, según corresponda) reforzaron el perfil de reconocimiento, significativamente sesgado, de los anticuerpos anti-TolT generados durante la infección por *T. cruzi* en humanos. Se observa que 4 de 4 sueros positivos (ninguno de ellos incluido en el ELISA) también reaccionan con la región C-terminal conservada entre A y B (Fig. R5.2B). Resultados similares se obtuvieron al probar muestras de suero de conejos, perros y ratones infectados con *T. cruzi* contra estas proteínas recombinantes mediante ELISA (Fig. R5.2A), reforzando la idea de que los epítomos B presentes en la región C-terminal conservada entre las TolT-A y -B son inmunodominantes.

Discusión y conclusiones

Como una primera aproximación para re-evaluar antigénica y funcionalmente a las proteínas TolT de *T. cruzi*, realizamos exhaustivos análisis genómicos. Nuestros resultados revelan que la complejidad de la familia TolT era ampliamente subvalorada. A diferencia de los apenas tres genes casi idénticos dispuestos en tándem descritos originalmente [78], solo en CL Brener se identificaron 11 secuencias, a partir de las cuales pudieron definirse tres grupos robustos de genes, a los que denominamos TolT-A, -B y -C. Rastros sistemáticos de los genomas de otras cepas de *T. cruzi* nos permitieron identificar muchísimas más secuencias, que se agruparon en estas mismas ramas. Adicionalmente, pudimos definir un subgrupo dentro de TolT-B (denominado TolT-B sin GPI) y un grupo adicional de secuencias aparentemente quiméricas entre TolT-A y -B (denominado TolT-A/B). También encontramos algunos pseudogenes para TolT, los que, junto a los probables eventos de quimerización de las TolT-A/B constituyen marcas distintivas de la evolución de las familias multigénicas en *T. cruzi* y en tripanosomátidos en general [115]. De acuerdo con la clasificación propuesta en este trabajo de Tesis, los ortólogos de los genes TolT1-3 originales [41] formarían parte del grupo TolT-A, mientras que la mezcla propuesta para serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas [81] incluiría, en principio, dos TolT-B canónicas (TcCLB.510433.20 y TcCLB.504277.11) y una TolT-A (TcCLB.504157.130). Es importante destacar que para capturar la diversidad total de esta familia, debimos generar primero una base de datos curada con todas las secuencias TolT presentes en los genomas disponibles en TriTrypDB (y otros genomas de acceso restringido). Sólo un 40% de las secuencias TolT identificadas en nuestros rastros estaban anotadas, y muchas de ellas de manera incorrecta, lo que da una idea de las limitaciones de los métodos actuales de anotación de los genomas de *T. cruzi*.

Los datos filogenéticos indican que TolT es una molécula de distribución restringida al clado de los tripanosomátidos. Más precisamente, al grupo de los tripanosomas estercorarios (los transmitidos por las heces del insecto vector) como *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *T. grayi*, *T. rangeli* y *T. theileri*. *T. melophagium* podría representar una excepción, aunque debe mencionarse que, si bien esta especie fue clasificada tentativamente dentro del grupo Salivaria (triplanosomas inyectados junto a la saliva del insecto vector), su forma de transmisión no ha sido dilucidada de manera concluyente [116].

En *T. cruzi*, los genes TolT se organizan diferencialmente en tres *clusters*, aunque no es posible descartar que los *clusters* 1 y 2 correspondan, en realidad, a una misma región genómica con pequeñas variaciones estructurales entre las DTUs. Independientemente de

esto, el patrón de distribución observado para estos tres *clusters* se ajusta al esquema evolutivo más aceptado para el taxón, en el cual TcI, TcII, TcIII y TcIV son las DTUs ancestrales y TeV y TeVI son DTUs híbridas, originadas por eventos de recombinación reciente entre TcII y TcIII. El *cluster* 3, por otro lado, es el único identificado por fuera de *T. cruzi* (y *T. cruzi marinkellei*), lo que sugiere fuertemente que se trata del *cluster* ancestral. Siguiendo con esta lógica, y desestimando posibles errores inducidos por *gaps* en la disponibilidad de información genómica y/o por el hecho de que la mayoría de los genomas de las especies analizadas han sido ensamblados en base al genoma de *T. cruzi*, la hipótesis más parsimoniosa indica que un gen TolT de este *cluster* 3 habría emergido en un ancestro común de los tripanosomas Estercoraria, como una innovación propia de este linaje o por transferencia horizontal a partir de una bacteria (ver debajo). Más allá de esto, la conservación estricta de las TolT en las distintas especies analizadas (*T. rangeli*, *T. theileri*, *T. grayi* y eventualmente *T. melophagium*) y su ‘reciente’ expansión/diversificación en *T. cruzi* indica que estas moléculas fueron seleccionadas positivamente, sugiriendo que confieren alguna ventaja adaptativa. Por duplicación génica seguida de diferenciación a partir de este gen original, que podría corresponder a un protogen del tipo TolT-B o -C, se habrían generado las demás variantes presentes en ese *cluster*: TolT-B o -C (dependiendo cual sea tomada como original) y TolT-B sin GPI. Solo en un antecesor común de *T. cruzi* y *T. cruzi marinkellei*, y ya involucrando al menos un evento de recombinación y/o translocación, habrían aparecido el *cluster* 2 y el 1 (*cluster* A, dado que alternativamente podrían ser vistos como variantes haplotípicas). En un evento evolutivamente más reciente, y ya en un ancestro común a todas las DTUs de *T. cruzi* (aunque posterior a la ‘especiación’ de *T. cruzi marinkellei*), habrían emergido en este *cluster* (o estos *clusters*) los genes TolT-A, claramente derivados a partir de TolT-B y, todavía más tarde, y ya restringidos a TcI, los genes TolT-A/B, posiblemente por recombinación entre genes TolT-A y -B (Figs. R1.6 y S1). Un esquema de la evolución propuesta para TolT se muestra en la Figura D1.

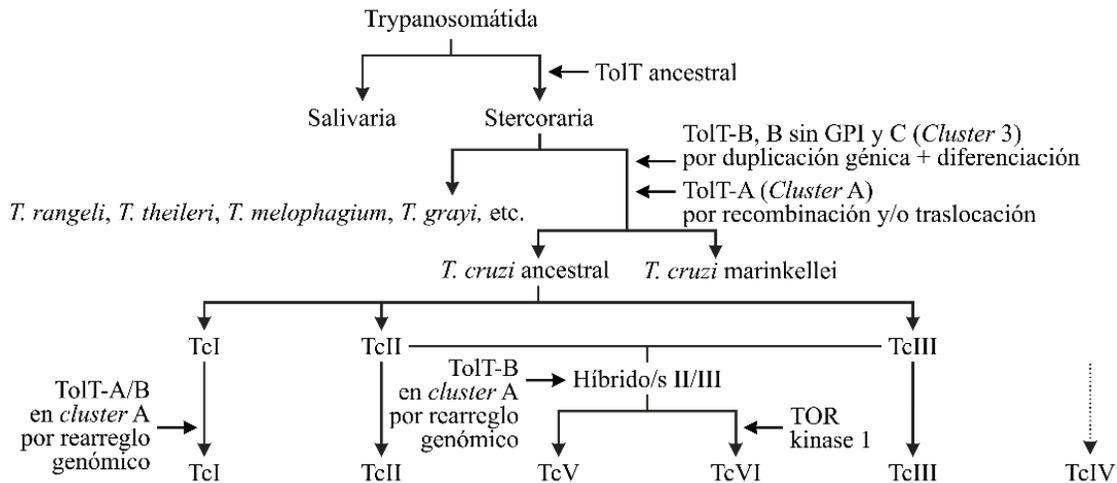


Figura D1: Hipótesis evolutiva de TolT. Representación esquemática que ilustra cómo habría sido el origen y la diversificación de TolT a lo largo del tiempo, en qué organismos y los procesos genéticos involucrados. *Cluster A*: *Clusters* 1 y 2 unificados.

Además de echar luz sobre el origen y la evolución de TolT, el análisis a escala genómica reveló algunos marcadores genéticos interesantes, particularmente dentro del denominado *cluster 2*, que podrían ser explorados con diferentes propósitos. Por un lado, las secuencias quiméricas TolT-A/B, que resultan distintivas de las cepas TcI. Por otro, la presencia conjunta de genes TolT-B y -A en un mismo *cluster*, que parece ser un marcador de cepas híbridas, TcV y VI. Por último, la inserción de una secuencia anotada como *TOR kinase 1* parece ser una huella genómica de las cepas TcVI. Este marcador es de particular interés, ya que una de las mayores limitaciones de los métodos de tipificación de *T. cruzi* usados actualmente es la discriminación entre cepas TcV y TcVI [117]. Todos estos hallazgos, si bien requieren más investigación y deben ser validados, podrían contribuir positivamente a mejorar la resolución de los esquemas de genotipificación, esenciales para la vigilancia epidemiológica y, eventualmente, para el manejo clínico de la Enfermedad de Chagas [118].

Comprender la distribución en la naturaleza y la variabilidad entre cepas es sumamente importante para la validación de potenciales biomarcadores en *T. cruzi* [119]. Esta información es particularmente relevante para el desarrollo de herramientas diagnósticas precisas que puedan detectar de manera específica todas las variantes del parásito (o discriminar entre ellas, dependiendo del objetivo del análisis) y que muestren una *performance* similar en distintas zonas endémicas [120], así como para diseñar vacunas eficaces que ofrezcan protección amplia contra la infección con *T. cruzi*. En el caso de TolT, a pesar de la variabilidad observada, las diferencias entre moléculas del mismo tipo en distintas cepas no parecen tener un mayor efecto, en principio, en su reconocimiento serológico. Los

anticuerpos contra las diferentes variantes, diseñados a partir de las secuencias de CL Brener, fueron capaces de reconocer todas las cepas ensayadas, sin importar su DTU. Por otro lado, la identificación de secuencias homólogas a TolT en otros tripanosomas, algunos de los cuales pueden infectar humanos [43], plantea la necesidad de evaluar de manera más rigurosa la especificidad de este marcador.

Las proteínas codificadas por los distintos grupos de TolT presentan tamaños y características bioquímicas y estructurales parcialmente diferentes. Sin embargo, a excepción de TolT-B sin GPI, todas ellas poseen señales descritas como responsables de la entrada a la vía secretoria y la localización en la cara externa de la membrana plasmática de otras glicoproteínas de *T. cruzi*, como mucinas, MASPs, TASVs y TSs [102]. Nuestros resultados respaldan un rol similar para estas secuencias en TolT. Otra particularidad destacable es la presencia del motivo Cys-X₇-Cys₃ en el SP de las TolT, también encontrado en mucinas con expresión restringida a estadios de mamífero (TcMUC). Teniendo en cuenta que la expresión de las TolT también es máxima en estadios de mamífero, podría hipotetizarse que este motivo ha sido seleccionado para mejorar la expresión y/o el procesamiento post-traducciona l de moléculas de superficie de estas formas del parásito. Alternativamente, se ha propuesto que la conservación de codones Cys en posiciones específicas está involucrada en la generación de diversidad por recombinación en familias génicas [121].

Las proteínas TolT presentan una estructura tridimensional común, ensamblada casi exclusivamente a partir de hélices α conectadas por giros. En esta estructura pueden distinguirse dos grandes dominios: un ‘tallo’ C-terminal, formado por un hélice α de gran longitud y una ‘cabeza’ N-terminal, formada por un apilamiento de un extremo de esta hélice α con otras dos, más cortas. Los modelos generados predicen la formación de un puente disulfuro intracatenario entre las Cys 75 y 127 y sus equivalentes, localizados en las hélices α cortas de la ‘cabeza’. Nuestros estudios experimentales soportan esta hipótesis y sugieren que estos residuos Cys son esenciales para la estabilización de las proteínas TolT y, eventualmente para su multimerización y/o formación de agregados moleculares en la superficie del parásito. En TolT-B, además, las hélices α de la ‘cabeza’ parecen establecer algún tipo de interacción no covalente, lo que sugiere un mecanismo adicional de estabilización de esta estructura. Debe mencionarse, no obstante, que no fue posible la generación y el análisis de mutantes, que permitieran dilucidar el rol de estas Cys *in vivo*. Además, debe considerarse que los experimentos realizados con proteínas recombinantes se llevaron a cabo antes del surgimiento de AlphaFold, motivo por el cual no se tuvo en cuenta su predicción para el diseño racional de las mismas. Por ejemplo, se podrían haber generado

cada una de las 2 α -hélices cortas con su correspondiente Cys, la α -hélice más larga que carece de Cys y/o las 2 α -hélices cortas unidas.

La comparación entre modelos generados para TolT y el dominio II de las proteínas Tola bacterianas, confirma la similitud de sus estructuras tridimensionales, tal como había sido propuesto [78]. Esta similitud lleva a considerar dos escenarios: podría tratarse de un caso de convergencia evolutiva, resultado de la necesidad de una arquitectura específica para realizar funciones similares. Las Tola bacterianas participan en la estabilización de la membrana externa y en la translocación de moléculas, incluyendo colicinas, que utilizan este sistema como receptor para atravesar la membrana. De manera análoga, el ‘tallo’ de TolT podría actuar como un espaciador molecular, para posicionar la ‘cabeza’ N-terminal por sobre el glicocalix del parásito [12] y favorecer así su interacción con otras proteínas de la membrana o del hospedador. Alternativamente, la similitud estructural podría asociarse a un evento de transferencia horizontal; la captación (y readaptación) de secuencias procariotas en el genoma de los tripanosomátidos ha sido reportada [110,122–126].

TolT había sido descrita originalmente como un antígeno de expresión exclusiva en el flagelo del estadio tripomastigote [75]. En este trabajo, confirmamos estos hallazgos para todos los grupos de TolT. La distribución punteada de TolT-A y -B es típica de las glicoproteínas de superficie de *T. cruzi* [102], y, junto a los resultados del análisis de colocalización por microscopía confocal así como de inmunoprecipitación, se confirma que se trata de moléculas distintas, con interacción prácticamente nula. El patrón de expresión de TolT en tripomastigotes presenta heterogeneidades, no sólo entre distintas cepas, sino también entre estadios e incluso entre miembros de un mismo grupo, lo que es compatible a un procesamiento post-traducciona diferencial, bastante común en miembros de familias multigénicas de *T. cruzi* [103,108]. Particularmente, nuestros resultados indican que TolT está sujeto a distintos grados de N-glicosilación, cuya estructura y complejidad son variables y, en algunos casos, parecería estar involucrada en el enmascaramiento de epítomos, por lo que podría tener un rol en la inmunogenicidad de estas moléculas.

Más relevante, nuestros datos muestran que las proteínas TolT también se expresan en el estadio amastigote. En este caso, además, cada grupo muestra una localización intracelular particular, lo cual parecería indicar que hay un procesamiento diferencial de las distintas proteínas y/o que estas se acumulan diferencialmente en distintos puntos de la vía secretoria del parásito, antes de llegar a la superficie. Los niveles de expresión de todos los grupos de TolT caen significativamente (hasta niveles indetectables) en los estadios de insecto (al

menos en epimastigotes), tanto a nivel de ARNm como de proteínas, lo cual es coincidente con otros análisis transcriptómicos y/o proteómicos recientes [127,128].

En la búsqueda de comprender las funciones en las que TolT estaría involucrada, fue que se intentó generar parásitos que la expresaran de forma homóloga. Como se describió anteriormente, el sistema utilizado no permitió obtener sobre-expresantes en el estadio de epimastigotes, así como tampoco mantener la sobre-expresión en estadios de mamífero que permitieran llevar a cabo ensayos funcionales. Probablemente, la falta de presión de selección ante la ausencia del antibiótico correspondiente en el cultivo celular, sumada a la heterogeneidad de la población parasitaria de partida promueve, para este caso, la selección de tripomastigotes no sobre-expresantes. Además, al menos para la línea transfectada con TolT-C, se sugiere que la no expresión de la molécula recombinante puede deberse en parte también a defectos en la diferenciación y/o ciclado. Estas dificultades, sumadas a los largos tiempos que demandan estos experimentos y al cese de actividades impuesto por la pandemia, no permitieron la obtención de cantidades suficientes de parásitos (estadios de mamífero) para realizar ensayos funcionales estandarizados, así como tampoco para llevar a cabo la medición de la expresión a nivel de ARNm, la purificación de proteínas ancladas por GPI, estudios de interacción molecular establecidos por las TolT *in vivo*, o el análisis de multimerización de manera robusta y reproducible. Con este panorama, algunas posibles estrategias alternativas a evaluar en el futuro serían: i) emplear una línea celular que sea resistente a G418; ii) utilizar un sistema de expresión homóloga regulable, como pTcINDEX [129]; iii) reemplazar las regiones no traducidas (*untranslated regions*, UTRs) aportadas por el plásmido por las propias de TolT.

Interesantemente, estudios de otros laboratorios revelaron que algunas secuencias de TolT pueden identificarse en distintos contextos. Como se mencionó previamente, una secuencia TolT, ahora identificada como TolT-B sin GPI (TcCLB.504277.20), se detectó entre las proteínas asociadas a la cromatina más abundantes en tripomastigotes [96], mientras que una TolT-A (TcCLB.506617.20) fue detectada en vesículas extracelulares de macrófagos infectados con *T. cruzi* [130]. Otra secuencia TolT-A (TCSYLVIO_009289), por su parte, fue detectada en interacción específica con las UTRs de los ARNm de LYT1, un factor de virulencia de *T. cruzi*, en tripomastigotes [131]. Todas estas evidencias, en resumen, sugieren que TolT podría estar implicada en funciones relacionadas con la estabilización de la membrana, la regulación de la expresión génica y/o la modulación de la respuesta inmune.

Nuestros resultados indican que la antigenicidad de TolT está dirigida hacia su C-terminal. De acuerdo con los datos reportados desde el microarreglo de péptidos, TolT-A y

-B poseen un epítipo común denominado A3/B3, que resulta reconocido por sueros de pacientes de distintas zonas endémicas (y, por lo tanto, posiblemente infectados con distintas cepas), pero con una prevalencia relativamente baja, excepto para sueros de Argentina. Sin embargo, TolT-C resulta aún más prometedora, dado que el epítipo denominado C2, identificado en la secuencia TCSYLVIO_004014, perteneciente a la cepa Sylvio, fue reconocido por sueros de todos los países analizados, con una seroprevalencia de casi el 90%. La falta de reconocimiento de este epítipo en la secuencia perteneciente a CL Brener podría deberse a que, de acuerdo a los datos resultantes de un análisis de tipo *alanine-scan mutagenesis* sobre parte del mismo (de A273 a Q292), se observó que el reemplazo de los aa D281 y K282 es lo que más disminuye el reconocimiento antigénico, y la secuencia de CL Brener posee un residuo E en la posición 281 [113]. Algo a tener en cuenta es que esta antigenicidad, evaluada mediante microarreglos, resultó relativamente baja al compararse con la de otras familias de moléculas de superficie, como TSSA, cuya señal duplica a la de TolT; sin embargo, esta es suficiente para que TolT sea considerado un antígeno de interés para el diagnóstico y monitoreo de la Enfermedad de Chagas. Además, como se describió previamente, también se analizó la antigenicidad sobre proteínas recombinantes, donde es relevante resaltar la alta prevalencia en los sueros analizados (todos de Argentina) sobre el reconocimiento del epítipo B2 (similar a A1), en contraste con lo observado en el microarreglo. Esto indica que este epítipo podría: i) incluir más de 16 residuos consecutivos (largo máximo de los péptidos analizados) y/o ii) tener un componente conformacional.

La identificación y validación de epítopos polimórficos entre cepas de *T. cruzi* es la base para el desarrollo de estrategias de serotipificación directa del parásito [53,132]. La capacidad de estas secuencias para detectar anticuerpos y correlacionarse con la respuesta de las células T en humanos y animales ofrece nuevas perspectivas, que deberían centrarse en su optimización y combinación con otros biomarcadores para mejorar la precisión y la eficacia del diagnóstico y tratamiento en poblaciones humanas y en otros hospedadores mamíferos. En relación con esto último, debería considerarse que las distintas mezclas propuestas para serodiagnóstico son parcialmente redundantes (contienen 2 moléculas TolT-B idénticas) y, más importante, podrían simplificarse a la expresión de la región C-terminal de TolT-A o -B, quizás adicionada con un representante del grupo TolT-C.

En definitiva, y si bien aún quedan desafíos por delante, los hallazgos presentados en esta Tesis contribuyen al conocimiento de la biología de *T. cruzi* y al desarrollo e implementación de estrategias conducentes a un mejor control de la Enfermedad de Chagas, de gran relevancia e impacto regional.

Materiales y métodos

Análisis bioinformático

Secuencias: Las genomas de los aislamientos Brazil A4 (TcI), Dm28c (TcI), Sylvio X10/1 (TcI), Berenice (TcII), Y C6 (TcII), CL Brener (TcVI) y TCC (TcVI) de *T. cruzi* se tomaron de la base de datos TriTrypDB (tritrypdb.org/tritrypdb/), mientras que los de las cepas MT3663 (TcIII), Jose Julio (TcIV) y BOL-FC10A (TcV) se obtuvieron en el Instituto Pasteur de Montevideo y fueron gentilmente cedidos por el Dr. Carlos Robello. El genoma de RA se obtuvo en nuestro laboratorio (Dra. Virginia Balouz, resultados sin publicar). Los genomas de los aislamientos Dm28c, Y C6, TCC, MT3663, Jose Julio, BOL-FC10A y RA fueron obtenidos usando métodos NGS, basados en lecturas largas (PacBio, Nanopore), por lo que presentan alta calidad de ensamblaje y, por ende, mejor resolución de sus regiones repetitivas. La búsqueda de homólogos de las secuencias de interés se llevó a cabo utilizando BLASTn.

Análisis de secuencias: Para la predicción de señales de secreción/direccionamiento al retículo endoplasmático, SP, se usó SignalP 6.0 [133], y para la de señales de anclaje por GPI se usó PredGPI [134]. Para la predicción de señales de fosforilación, N-glicosilación, O-glicosilación y palmitoilación se utilizaron los algoritmos NetPhos 3.1, NetNGlyc 1.0, NetOGlyc 4.0 y CSS-Palm 4.0 [135–138], respectivamente.

Alineamiento de secuencias y análisis de filogenia: Los alineamientos de secuencias se realizaron utilizando el algoritmo Clustal Omega [139] y se visualizaron en Jalview [140]. La construcción de árboles filogenéticos se realizó utilizando MEGA [141], de acuerdo al método de *Neighbor-Joining* con un análisis de *bootstrap* de 1000 repeticiones. Para los gráficos de sintenia se utilizó el paquete gggenomes de R [142].

Análisis estructural: Para la predicción de la estructura tridimensional de proteínas se utilizó AlphaFold [105,106] y para su visualización, análisis y edición, Chimera X [143].

Materiales y técnicas de laboratorio

Bacterias

Cepas: Para procedimientos de clonado se usaron *E. coli* DH5 α , genotipo: F– Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ – thi-1 gyrA96 relA1. La expresión de proteínas recombinantes se hizo en *E. coli* BL21-Codon Plus®, genotipo: F- ompT hsdS (rB - mB -) dcm+ Tetr gal λ endA Hte (argU ileY leuW Camr).

Cultivo: El cultivo de bacterias se efectuó a 37°C en agitador rotatorio (200-250 rpm) o en placas de Petri con 1.5% p/v de agar en medio LB (Luria Bertani: 10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura, 5 g/L NaCl, pH 7). Para la selección, el medio fue suplementado con antibióticos: 100 µg/mL Ampicilina, 34 µg/mL Cloranfenicol y/o 30 µg/mL Kanamicina.

Generación y transformación de bacterias competentes: La generación de bacterias *E. coli* DH5α y BL21-Codon Plus® ultra-competentes fue llevada a cabo a través del método de Inoue et al. [144]. La transformación de bacterias con ADN plasmídico fue efectuada mediante *shock* térmico a 42°C, según [145].

Células

Cultivo: Se cultivaron células Vero (una línea de tipo fibroblasto derivadas de riñón de mono verde africano) libres de micoplasma (obtenida de ATCC) a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 5-10% v/v suero fetal bovino (SFB), 0.292 g/L L-glutamina, 100 IU/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomicina (Gibco).

Parásitos

Aislamientos: Se trabajó experimentalmente con los clones/cepas Dm28c (TcI), Sylvio X10/1 (TcI), Y C6 (TcII), CL Brener (TcVI), TCC (TcVI) y RA (TcVI) de *T. cruzi*.

Cultivo y obtención de estadios: El estadio epimastigote fue obtenido de cultivos axénicos crecidos a 28°C con agitación en medio BHT (*Brain-Heart Tryptose*) suplementado con 10% v/v SFB inactivado por calor, 20 µg/L Hemina, 100 IU/mL Penicilina y 100 µg/mL Estreptomicina; y se cosechó en fase exponencial de crecimiento. Los estadios tripomastigote y amastigote derivados de células fueron obtenidos a partir de monocapas de células Vero infectadas. Los tripomastigotes fueron enriquecidos por natación [108] y cosechados del sobrenadante por centrifugación a 7000 rpm. Los amastigotes fueron obtenidos por centrifugación diferencial a partir de *pellets* de células lisadas. El estadio tripomastigote metacíclico (derivado de la diferenciación de epimastigotes) fue obtenido a partir de cultivos en fase estacionaria tardía crecidos a 28°C sin agitación. Estas formas no se purificaron, sino que fueron usadas como mezclas de composición indefinida (epimastigotes y metacíclicos) para infectar células Vero.

Transfección de epimastigotes por electroporación: Epimastigotes axénicos en fase exponencial de crecimiento fueron lavados dos veces con BHT sin SFB a una concentración

final de 500×10^6 parásitos/mL y se colocaron alícuotas de 350 μ L en cubetas de electroporación de 0.4 mm conteniendo 10 μ g de ADN plasmídico en un volumen de 10-15 μ L. Los parásitos fueron sometidos a dos pulsos sucesivos de 335 V y 1400 μ F, incubados 5 min en hielo, diluidos 1:10 en BHT 10% SFB y recuperados por 24 h a 28°C, tras lo cual se agregó 100 μ g/mL de G418. Luego de la selección, los parásitos se cultivaron como se explicó anteriormente, con el suplemento de G418.

Infecciones de células con tripomastigotes: Para los ensayos de infección de células en general, se infectaron 10^3 células Vero sobre vidrios circulares en placas multipocillos de 24 con 10^5 tripomastigotes/pocillo (M.O.I. = 100). Luego de 24 o 48 h, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% v/v en *buffer* fosfato salino (PBS: 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 0.24 g/L KH₂PO₄, pH 7.4) durante 30 min a temperatura ambiente (TA) y se procesaron para IFI.

Técnicas de biología molecular y ADN recombinante

Electroforesis de ADN: Los fragmentos de ADN fueron separados con fines analíticos o preparativos en geles con distintos porcentajes de agarosa corridos en cubas electroforéticas y teñidos con bromuro de etidio 0.5 μ g/ml. Las muestras fueron sembradas en *buffer* de siembra (naranja-G 0.04% p/v, glicerol 5% v/v) y el *buffer* de corrida utilizado fue TBE (Tris-Borato 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2.5 mM pH 8.3). El ADN se visualizó por exposición a luz UV.

Purificación de ADN total de T. cruzi: Para la purificación de ADNg de *T. cruzi* se cosecharon epimastigotes en fase exponencial centrifugando a 4000 rpm, 5 min a 4°C y lavando tres veces con PBS. Se utilizó el método de extracción por fenol-cloroformo-isoamílico seguido de una precipitación con etanol [146]. La concentración (260 nm) y calidad (260/280 y 260/230 nm) fueron medidas utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Micro-volumen (Thermo Scientific™ NanoDrop™).

Purificación de ARN total de T. cruzi: Se partió de aproximadamente 400×10^6 parásitos y se utilizó el reactivo comercial TRAzol (Dongsheng Biotech) siguiendo las indicaciones del fabricante [109]. La cantidad (260 nm) y pureza (260/280 y 260/230 nm) del ARN se estimó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Micro-volumen (Thermo Scientific™ NanoDrop™). La integridad se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1% p/v.

Purificación de ADN plasmídico: El ADN plasmídico se purificó, en general, mediante el método de lisis alcalina [147]. Para secuenciación, el ADN fue desalado y precipitado con NaCl 0.4 M y PEG8000 2.5%. La purificación de bandas escindidas de geles de agarosa se hizo con el *kit* PURO (PB-L).

Digestión de ADN con enzimas de restricción: Se utilizó 1 UE (unidad enzimática) por μg de ADN, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las digestiones se realizaron en el *buffer* recomendado durante 3 h a 37°C.

Ligación de fragmentos de ADN: Las reacciones se realizaron utilizando 100 ng de plásmido y la cantidad de inserto necesaria para una relación inserto:plásmido de 3:1, en un volumen final de 10 μl . Se incubó en el *buffer* correspondiente, con 0.4 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 a 16°C, durante toda la noche (*overnight*, ON; aprox. 16 h). Las ligaciones de productos de PCR se realizaron en el plásmido comercial pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Se utilizaron oligonucleótidos específicos derivados de las secuencias de los genes de interés (ver Tabla S2). La reacción se realizó en un volumen final de 50 μl utilizando Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen) en el *buffer* provisto por el fabricante, junto a MgCl_2 1,5 mM, 200 ng de cada oligonucleótido y 50 μM concentración final de cada desoxinucleótidos trifosfato (dNTP). La amplificación se realizó en 35 ciclos que constan de: -desnaturalización 1 min a 95°C, -hibridación 30 seg a la temperatura correspondiente, -extensión a 72°C durante 1 min por cada 1 Kb a amplificar. El cálculo de la temperatura de hibridación se efectuó utilizando NEB Tm Calculator, herramienta provista por NEB (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>). Se empleó este mismo esquema tanto para moldes de tipo ADNg como para plásmidos bacterianos.

SOEing PCR (Splicing by Overlap-Extension PCR): Se diseñaron 4 oligonucleótidos sobre cada región de interés (ver Tabla S2). Dos de estos oligonucleótidos, los centrales, contienen las secuencias necesarias para generar la modificación deseada [148]. Utilizando las combinaciones Fw2-Rv2 y Fw3-Rv1, conforme al protocolo de PCR descrito previamente, se amplificaron dos fragmentos de ADN con una región de solapamiento en uno de sus extremos (el final del primero con el inicio del segundo). Luego, estos fragmentos se mezclaron en proporciones equimolares y, nuevamente siguiendo el protocolo de PCR ya

descrito, estos fragmentos se fusionaron. La presencia de los oligonucleótidos terminales (Fw2-Rv1) permitió la amplificación exitosa del producto final.

RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR): Las reacciones de transcriptasa reversa partieron de 3 µg de ARN utilizando oligo-dT 10 µM, dNTPs 10 mM y la transcriptasa reversa M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma-Aldrich) en el *buffer* provisto por el fabricante.

PCR cuantitativa en tiempo real (Real-time qPCR): Muestras de ADN copia de los distintos estadios de *T. cruzi* CL Brener preparadas como se explicó previamente (RT-PCR) se analizaron por qPCR utilizando el *kit* KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La incubación y las mediciones se llevaron a cabo con el equipo 7500 Real-time PCR System (Applied-Biosystems) y las condiciones fueron: pre incubación de 2 min a 50°C, un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min y 40 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 95°C por 15 seg y 63°C por 1 min. La cuantificación relativa de los genes de interés se realizó con LinRegPCR [149,150], que calcula la eficiencia de cada curva de fluorescencia vía regresión lineal en la parte exponencial de la reacción. Como control endógeno se usaron los genes Calmodulina y GAPDH de *T. cruzi*. Para calcular la relación entre el gen de referencia y el gen *target*, incluyendo la corrección de la eficiencia, se utilizó la fórmula modificada de Pfaffl [151].

$$ratio = \frac{(E_{(ref)})^{C_R^{(ref)}}}{(E_{(target)})^{C_R^{(target)}}}$$

Diseño y validación de oligonucleótidos para Real-time qPCR: Se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos en regiones divergentes de TolT-A, -B y -C (Tabla S2). Se utilizaron las secuencias TcCLB.506617.10, TcCLB.510433.20 y TcCLB.504277.30 respectivamente, las cuales fueron cargadas en el *software* PerlPrimer v1.1.21 [152]. Se eligieron aquellos que hibridan en las secuencias de interés minimizando la amplificación cruzada. Cada par fue utilizado en reacciones de PCR a punto final para evaluar la amplificación de un solo producto de tamaño esperado y la ausencia de producto en el control sin templado. Los productos obtenidos en cada reacción fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy (Promega) y secuenciados con los oligonucleótidos T7 y SP6, los cuales flanquean al sitio de clonado múltiple (MCS; Tabla S2). Luego de esta validación se procedió con la realización y cuantificación de la *Real-time* qPCR. Al finalizar cada experimento se realizaron curvas de disociación para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos (Fig. MM1).

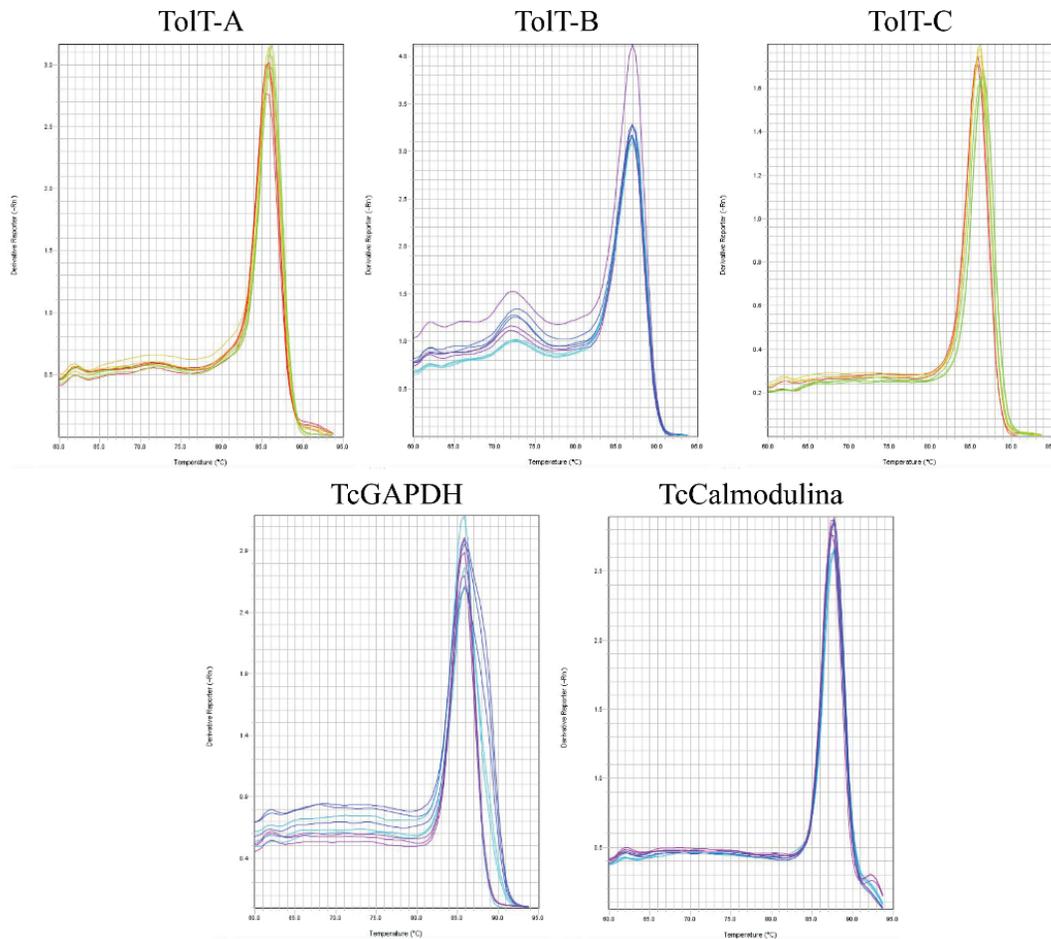


Figura MM1: Especificidad y pureza de los productos de Real-Time qPCR. Curvas de disociación de TolT-A, TolT-B, TolT-C, TcGAPDH y TcCalmodulina. Se representa la fluorescencia (*derivative reporter* (ΔR_n)) en función de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Expresión y análisis de proteínas

Expresión y purificación de proteínas recombinantes en sistemas procariontes: Para la expresión de proteínas recombinantes como fusiones traduccionales a la enzima GST, se utilizaron plásmidos de expresión procarionte de la línea pGEX (Pharmacia Biotech). También se expresaron construcciones fusionadas a etiquetas 6xHis en plásmidos pET (Novagen). La purificación se realizó a partir de cultivos bacterianos crecidos ON, diluidos 20 veces en LB y crecidos aproximadamente 3 h a 37°C con agitación hasta una densidad óptica (DO) de 0.6 a 600 nm. Los cultivos se indujeron agregando Iso-Propil-Tio- β -D-Galactósido (IPTG) 0,25-1 mM y se dejaron crecer por 3 h adicionales a 37°C en agitación. Los *pellets* de bacterias cosechados se resuspendieron en *buffer* de lisis (EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y TX-100 1% v/v en PBS o NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, PMSF 1 mM y TX-100 0.2 % v/v) y se lisaron por sonicación. Las fracciones solubles se incubaron ON a 4°C con la resina Glutathione Sepharose 4 Fast Flow o Ni Sepharose

(ambas de Cytiva), según corresponda. Las proteínas se eluyeron con glutatión reducido 15 mM en Tris-HCl 50 mM pH 7.6 o Imidazol 500 mM pH 8 y se verificó su pureza e integridad en SDS-PAGE teñidos con CBB. La cuantificación se realizó por el método de Bradford según las indicaciones del fabricante (BioRad) usando como estándar soluciones de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA).

SDS-PAGE: Se utilizaron geles de distintos porcentajes de acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (principalmente 12.5%) según [145]. Las muestras se sembraron con *buffer* de siembra (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, dodecil sulfato sódico -SDS- 1% p/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.1% p/v con o sin DTT 100 mM). Los geles se corrieron en cubas electroforéticas y luego fueron teñidos con CBB G-250 o transferidos a membranas (WB).

Sueros de infección, inmunización de animales y obtención de antisueros

Sueros humanos de infección con T. cruzi: El panel de sueros de pacientes infectados (entre 10 y 65 años de edad, de ambos sexos, cursando la fase crónica de la enfermedad, sin sintomatología asociada) fue provisto por el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén” (Buenos Aires, Argentina). Las muestras de sangre se obtuvieron por venipuntura y se analizó la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* por dos *kits* comerciales disponibles: ELISA, utilizando homogenato total de parásito, y hemoaglutinación indirecta (HAI, Wiener lab). Los sueros negativos se obtuvieron de distintos bancos de sangre: Fundación Hemocentro Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina), Hospital de Enfermedades Infecciosas ‘Dr. Francisco Javier Muñiz’ (Buenos Aires, Argentina), Hospital Italiano de Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina) y Hospital Municipal ‘Dr. Diego E. Thompson’ (San Martín, Buenos Aires, Argentina).

Otros sueros de infección con T. cruzi: Los sueros de conejos, ratones y perros infectados experimentalmente fueron provistos por Daniel Sánchez, Valeria Tekiel (ambos del IIBio, UNSAM) y Marta Cardinal (FCEyN, UBA), respectivamente. En todos los casos, se usaron sueros de animales sin infectar como controles.

Obtención de sueros de inmunización: Para la obtención de antisueros (Tabla S1), 25 µg de cada proteína fusionada a GST fueron emulsionados en adyuvante completo de Freund e inyectados intraperitonealmente en ratones BALB/c (de 60-90 días de vida). A los 30 y 45 días post-inmunización se realizaron dos inoculaciones extra (*boosts*) con 12.5 µg del mismo inmunógeno emulsionado en adyuvante incompleto de Freund. Los ratones se sangraron a

blanco y los sueros se obtuvieron por centrifugación tras dejar coagular la sangre 30 min a 37°C. El suero anti-TolT-A generado en rata fue provisto por Juan Mucci (IIBio, UNSAM).

Inmunoensayos

Western-Blot (WB): Los geles SDS-PAGE fueron transferidos a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante el dispositivo de transferencia húmeda (BioRad) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para el análisis de WB, las membranas se bloquearon 1 h a TA en agitación con solución de bloqueo (leche descremada 5% o 1% p/v en PBS con 0.05% Tween 20 (PBST)), se incubaron con los anticuerpos monoclonales o los antisueros correspondientes (dilución 1:10000 y 1:250-1:500, respectivamente; en la misma solución) durante 1 h a TA u ON a 4°C, en agitación. Los lavados (3 de 5 min c/u) se realizaron en PBST. Finalmente se incubó con anticuerpos secundarios acoplados a *Horse-Raddish Peroxidase* (HRP, Sigma-Aldrich) o a los fluorocromos IRDye® 800-CW o 680-RD (Li-Cor Biosciences, dilución 1:5000 y 1:10000 en solución de bloqueo, respectivamente) durante 1 h y se reiteraron los lavados. El revelado se efectuó por quimioluminiscencia utilizando el sustrato SuperSignal West Pico (Pierce) sobre placas radiográficas, o por fluorescencia utilizando el escáner Odyssey IR basado en láser (Li-Cor, Inc.).

Dot-Blot: Se colocó una gota de la proteína de interés sobre una membrana de PVDF. Luego, la membrana se bloqueó 1 h a TA en agitación con solución de bloqueo (leche descremada 1% p/v en PBST), se incubó con el antisuero correspondiente (dilución 1:250-1:500, en la misma solución) durante 1 h a TA u ON a 4°C, en agitación. Los lavados (3 de 5 min c/u) se realizaron en PBST. Finalmente se incubó con anticuerpos secundarios acoplados a los fluorocromos IRDye® 800-CW (Li-Cor Biosciences, dilución 1:10000 en solución de bloqueo) durante 1 h y se reiteraron los lavados. El revelado se efectuó por fluorescencia utilizando el escáner Odyssey IR basado en láser (Li-Cor, Inc.) [70].

Inmunoprecipitación (IP): Se resuspendieron 2×10^8 tripomastigotes cepa CL Brener en 1 mL de *buffer ip* (PBS con TX-100 0.1% v/v y un *cocktail* inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich)). A este extracto (fracción de entrada o *input*) se le añadieron 6 μ L del suero anti-TolT-A generado en rata y se incubó ON a 4°C con agitación constante. Se añadieron 150 μ L de proteína G-Sepharose (GE Healthcare) previamente lavada con 500 μ L de *buffer ip*, y se incubó por 3 h a 4°C con agitación constante. Se centrifugó a 600 x g durante 1 min, se retiró el sobrenadante (fracción *flow-through*) y la resina se lavó 5 veces con 1 mL de *buffer ip*. Las fracciones *input*, *flow-through* e inmunoprecipitada (IP) fueron analizadas por WB.

Immuno-Fluorescencia Indirecta (IFI): Para los ensayos de IFI, las formas extracelulares de parásitos se cosecharon y lavaron en PBS, se adhirieron 1×10^6 a cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), se fijaron por 30 min en PFA 4% p/v en PBS, se bloquearon por 30 min en BSA (Sigma-Aldrich) 4% p/v en PBS (PBSA) suplementado con saponina al 0.5% p/v para permeabilizar y se incubaron con el anticuerpo correspondiente diluido en PBSA. Tras 3 lavados en PBS, se agregó el anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor (Molecular Probes) y DAPI (10 $\mu\text{g/ml}$) para la tinción de los núcleos y por último se montó sobre un portaobjetos con el reactivo FluorSave (CalBiochem). Para evaluar estadios intracelulares, 10000 células Vero se colocaron en cubreobjetos y tras incubarlas ON se infectaron con 1×10^6 tripomastigotes por cubreobjeto. Tras 16 h, se lavaron con PBS, se fijaron y procesaron como se describió anteriormente. En ambos casos, previo al bloqueo, se incubó con cloruro de amonio 25 mM en PBS para disminuir la fluorescencia basal. Los antisueros se utilizaron 1:25-1:50, mientras que los anticuerpos monoclonales 1:250 y los anticuerpos secundarios 1:1000. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara DS-Qi1 CCD y fueron procesadas con el programa ImageJ [153]. Para los ensayos de colocalización, tripomastigotes fijados y adheridos a cubreobjetos (como se describió anteriormente) fueron bloqueados con BSA (Sigma-Aldrich) 3% p/v y suero de caballo 2% v/v en PBS (PBS-AHS) e incubados con los sueros anti-TolT-A generado en rata y anti-TolT-B generado en ratón (dilución 1:100). Tras los lavados se agregaron los anticuerpos secundarios (dilución 1:1000). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Olympus IX-81 acoplado al módulo confocal FV-1000 y el análisis de colocalización se realizó con el *plugin* Colocalization Finder de ImageJ.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Se realizó la adsorción de 75 ng antígeno a placas de 384 pocillos (Nunc MaxiSorp) en 30 μL de *buffer* bicarbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM pH 9.6) a 4°C durante 16 h [154]. A continuación se bloqueó 1 h a 37°C en solución de bloqueo (leche descremada 4% p/v en PBST), se lavó 3 veces con PBST y se incubó con el antisuero primario (dilución 1:500 para humano y conejo, 1:400 para ratón y 1:1000 para perro) por 1 h a 37°C. Luego se lavó y se incubó 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a HRP, dilución 1:2500 para humano y 1:5000 para el resto (Sigma-Aldrich). Finalmente se lavó el anticuerpo secundario y se procedió con el revelado y finalización de la reacción para luego hacer la lectura de absorbancia a 450 nm. Las soluciones de revelado (1 mg de TMB (Sigma-Aldrich), 333 μL de DMSO y 120 μL de

H₂O₂ (30 vol) en 10 mL de *buffer* citrato 0.1 M pH 4.2) y finalización (H₂SO₄ 2 M) fueron idénticas para todos los ensayos. La detección colorimétrica se realizó con el sistema FilterMax F5 Multimode Microplate Reader (Molecular Devices). Los sueros se analizaron por duplicado y todos los valores de absorbancia fueron relativizados al valor de un suero positivo analizado en cada ensayo.

Criterios de positividad y negatividad en ELISA: Con el objetivo de determinar la positividad o negatividad de los sueros, se incluyeron en cada ensayo de 2 a 4 muestras de sueros de individuos no infectados con *T. cruzi* con características similares a los del muestreo. Los sueros analizados se consideraron: i) positivos, si la media de la absorbancia de las muestras menos 3 DE era mayor a la media obtenida para el mismo antígeno con los sueros negativos más 3 DE; ii) negativos, si la media menos 3 DE era menor a la media para el mismo antígeno con los sueros negativos más 3 DE.

Técnicas bioquímicas

Purificación de fracciones enriquecidas en proteínas ancladas por GPI: Un esquema de este protocolo se presenta en la Fig. MM2. Brevemente, se homogeneizaron 1.5×10^8 parásitos en 2 mL de *buffer* GPI (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, TX-114 2% v/v, PMSF 1 mM y un *cocktail* inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich)) y se incubaron 1 h en hielo. El homogenato se centrifugó a 8800 x g por 10 min a 0°C y el sobrenadante (S1) se guardó a -20°C durante 24 h. El *pellet* (P1) se lavó con 1 mL de *buffer* A (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, TX-114 0.06% v/v, PMSF 1 mM) y se guardó. El S1 fue descongelado y sometido a separación de fases a 37°C por 10 min seguida de centrifugación a 3000 x g por 3 min a TA. La fase acuosa (S2) fue recuperada y la fase de detergente se resuspendió en 1 mL de *buffer* A, se incubó 30 min a 0°C y se sometió a una re-extracción. La fase superior (S3) se recuperó nuevamente y la fase rica en detergente fue re-tratada con 1 mL de *buffer* A, con el cual se homogeneizó y se incubó a 0°C durante 30 min para luego centrifugarse a 18000 x g por 10 min a 0°C. El *pellet* (P2) se lavó con 1 mL de *buffer* A y se guardó mientras que el sobrenadante (S4) se sometió a una nueva fase de separación. La fase superior (S5) fue recolectada y la inferior, rica en detergente y enriquecida en proteínas ancladas por GPI, se recolectó como fracción GPI (GPI). Esta última se precipitó agregándole 4 volúmenes de acetona fría, incubando a -20°C ON y luego centrifugando 10 min a 18000 x g a TA. Las distintas fracciones (P1, P2, S2, S3, S5 y GPI) se resuspendieron en *buffer* de siembra y se analizaron por WB.

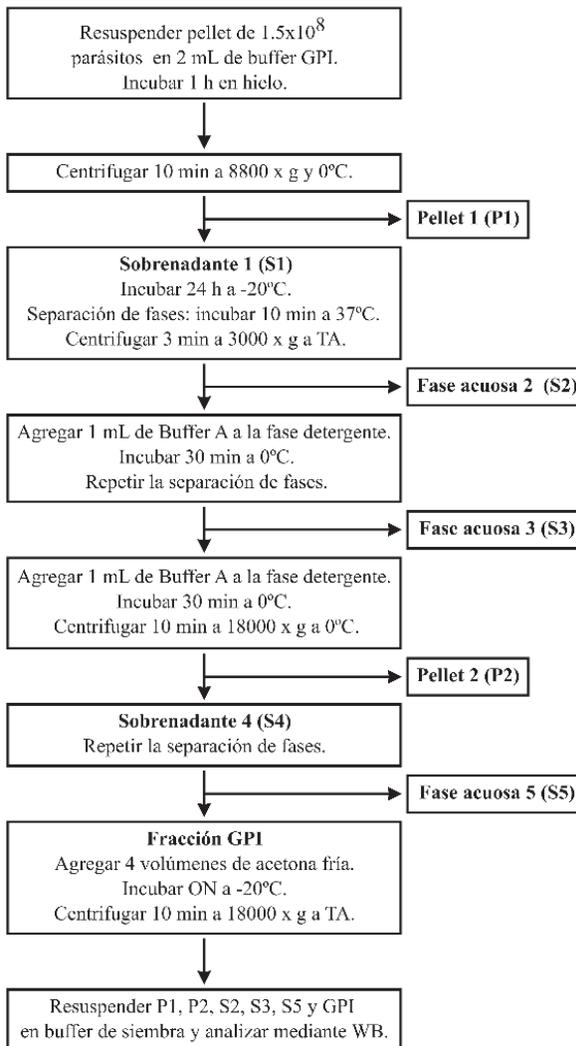


Figura MM2: Resumen del protocolo de purificación de fracciones enriquecidas en proteínas ancladas con GPI con TX-114. Adaptado de [155].

Tratamiento con PI-PLC (phosphatidylinositol phospholipase C): Se trataron 5×10^7 tripomastigotes incubándolos con 0.1 U de PI-PLC recombinante de *Bacillus cereus* (Thermo) a 4°C durante 30 min. Se chequeó la morfología y motilidad pre y post tratamiento. Luego se centrifugó para obtener el *pellet* de parásitos y su sobrenadante, los cuales se procesaron para ser analizados por WB.

Fraccionamiento con ConA (Concanavalina A): Pellets de 3×10^8 tripomastigotes se homogeneizaron en 500 μ L de *buffer* ConA (Tris/HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, TX-100 1% v/v, Nonidet P40 0.1 % v/v, deoxicolato de sodio 0.1 % p/v, Cl_2Ca 5 mM, Cl_2Mg 5 mM, Cl_2Mn 5 mM, *cocktail* inhibidor de proteasas 1% v/v (Sigma-Aldrich) y DTT 1 mM) y se fraccionaron incubándose con 100 μ L de ConA-Sepharose (GE Healthcare) ON a 4° C.

Las glicoproteínas retenidas se eluyeron con 150 μ L de *buffer* ConA suplementado con α -metilmanosido 0.5 M (Sigma-Aldrich).

Tratamiento con Endo-H (Endoglycosidase H): Se resuspendieron 2.5×10^7 tripomastigotes en *Glycoprotein Denaturing Buffer* 1X (Biolabs), se incubó 10 min a 100°C, y se trató con 2000-3000 U de Endo-H (Biolabs) durante 1 h.

Técnicas biofísicas

Dicroísmo circular (DC): La proteína recombinante a analizar se purificó en *batch* empleando una matriz de Níquel. Dado que la elución se realizó en presencia de grandes concentraciones de imidazol, el cual interfiere en la lectura, la solución proteica eluida se dializó 2 veces contra PBS a 4°C. Como control se utilizó el *buffer* de elución sometido a las mismas condiciones que la muestra. La lectura se llevó a cabo con el equipo Chirascan V-100. El servicio fue prestado por el Laboratorio de Biofísica Estructural y Química Bioorgánica de Proteínas, Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Anexos

Antisueros

Tabla S1: Antisueros generados

Nombre	Inmunógeno	Especie
TolT-A _{ratón}	F54-T174 de TcCLB.506617.10	Ratón
TolT-A _{rata}	L106-K179 de TcCLB.506617.10	Rata
TolT-B	Q61-S103 de TcCLB.510433.20	Ratón
TolT-B sin GPI	E248-W276 de TcCLB.504277.20	Ratón
TolT-B/A	G155-A260 de TcCLB.510433.20	Ratón
TolT-C	A83-S313 de TcCLB.504277.30	Ratón
TolT-C (péptido)	K144-H163 de TcCLB.504277.30	Ratón

Oligonucleótidos

Tabla S2: Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Descripción	Secuencia (5'-3')
Oligonucleótidos empleados en la generación de construcciones		
BFw1	TolT-B desde Q61	CG <u>ggatcc</u> CAGGAGTACGCTGATGAGGCT
BRv3	TolT-B hasta A260	CG <u>gaattc</u> GCGCTGCGTCATTCCCCTTCT
BRv1	TolT-B hasta S103	CG <u>gaattc</u> GCTCATCCTTGTAGCCTCAGA
BFw2	TolT-B desde S97	CG <u>ggatcc</u> TCTGAGGCTACAAGGATGAGC
BRv2	TolT-B hasta L162	CG <u>gaattc</u> CAACAGCTCCGGTCCACTTCC
BFw3	TolT-B desde G155	CG <u>ggatcc</u> GGAAGTGGACCGGAGCTGTTG
ANtFw	TolT-A desde M1	<u>tctaga</u> ATGCTGGCGGTGATGGTGAT
BNtFw	TolT-B desde M1	<u>tctaga</u> ATGATGATGCACCCTTTCTT
B/ACtRv	TolT-B/A hasta C310	CGA <u>ctcgag</u> CTAGCACGATAAGAAGCC
ASOEingFw2	TolT-A desde R65 con C75 WT	<u>ggatcc</u> CGGGAGGAGGTGGATGAGGCCA ACCAGCATTGTGTGCAA
ASOEingRv1	TolT-A hasta K169	<u>ctcgag</u> CTACTTGTCCAAAAGATCCCCTG
BSOEingFw2	TolT-B desde K59 con C71 WT	<u>ggatcc</u> AAGGCGCAGGAGTACGCTGATGA GGCTAACCGGCACTGCGTG
BSOEingRv1	TolT-B hasta L162	<u>ctcgag</u> TCTACAACAGCTCCGGTCCACT

ASOEingFw1	TolT-A desde R65 con C75S	<u>ggatcc</u> CGGGAGGAGGTGGATGAGGCCA ACCAGCATAGTGTGCAA
BSOEingFw1	TolT-B desde K59 con C71S	<u>ggatcc</u> AAGGCGCAGGAGTACGCTGATGA GGCTAACCGGCACAGCGTG
ASOEingRv2	TolT-A hasta A129 con C127S	AGCCTCGCTTTCGGTCACGGCAGCCTT AGCTTCATT
BSOEingRv2	TolT-B hasta K124 con C123S	CCTTGCTTTCGGCCACGGCA
ASOEingFw3	TolT-A desde T125 con C127S	ACCGAAAGCGAGGCTGCAGA
BSOEingFw3	TolT-B desde E122 con C123S	GAAAGCAAGGCGGCGGAGGA
AFw	TolT-A desde F54	GC <u>ggatcc</u> TTTGACTGGGCATTCAAG
ARv	TolT-A hasta T174	GA <u>ctcgag</u> CTAAGTATGATTTGCCGCCTT
BsinGPIFw	TolT-B sin GPI desde E248	GA <u>ggattc</u> GAGAATGCCATGAGGGGTG
BsinGPIRv	TolT-B sin GPI hasta W276	GA <u>ctcgag</u> GGCCATTGCCACCTTAAAG
CFw	TolT-C desde A83	GA <u>ggatcc</u> GCGACAATGCAATGCATG
CRv	TolT-C hasta S313	GA <u>ctcgag</u> CTAACTCCCCTGCGTCTGAC TC
BsinGPIfullFw	TolT-B sin GPI desde M1	<u>tctaga</u> ATGCTGGCGGTGATGGTGAA
BsinGPIfullRv	TolT-B sin GPI hasta R285	<u>atcgat</u> TCTTAAAGTATATAAAA
CNtFw	TolT-C desde M1	<u>tctaga</u> ATGACGCGTAATAGGCTTTT
CCtRv	TolT-C hasta C344	CGA <u>ctcgag</u> CTAGCACCATGCAACAA
ANtRv	TolT-A hasta I287	<u>atcgat</u> AATGCCGCCGCCATCCACCCGCGG TCTCGTCCTTTGAA
B/ACTfW	TolT-B/A desde P280	CGA <u>gaattc</u> CCaCGGGTGGATGGC
BNtRv	TolT-B hasta I287	<u>atcgat</u> GATGCCGCCGCCATCCACCCGTGG TCTCGTCCTTTGAA
CNtRv	TolT-C hasta Y319	<u>atcgat</u> ATAGTTGCTGCTGCTGCTCACTCCC ACTGCGTCTGA
CCtFw	TolT-C desde S310	CGA <u>gaattc</u> AGTGGGAGTGACAGCAGC
pGEXFw	Oligo universal	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGT
pGEXRv	Oligo universal	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
T7	Oligo universal	AATACGACTCACTATAGGG
SP6	Oligo universal	ATTTAGGTGACACTATAG

Oligonucleótidos empleados en *Real-time* qPCR

A RT Fw	TolT-A	CTGGGCTTGAGAAAGAAGCAG
A RT Rv	TcCLB.506617.10/506617.20	CTGGAATTCCTGCTCCTCCT
B RT Fw	TolT-B	AGGCTACAAGGATGAGCAGG
B RT Rv	TcCLB.508767.10/510433.20	CCAACCTTAGTCTTCTCGTCC
C RT Fw		CCAAGAAATACGCCGAAGAG
C RT Rv	TolT-C TcCLB.504277.30	TTTGTTCAGTCGAATCTGCAGAG
Calm Fw	TcCalmodulin TcCLB.506391.10/506391.20/	CCCGACGGAGGCGGAGCTGC
Calm Rv	507483.30/507483.39/ 507483.50	GTCCACGTCGGCCTCGCGGA
GAPDH Fw	TcGAPDH TcCLB.506943.50/506943.60/	GTGCGGCTGCTGTCAACA
GAPDH Rv	509065.60/509065.70	AAAGACATGCCCGTCAGCTT
Oligo-dT-anchor		GCGAGCTCCGCGGCCGCGTTTTTTTTTTT TTTTTTTT

Plásmidos

Los plásmidos utilizados para la generación de las construcciones fueron pGEM T Easy, pET28a(+), pGEX-2T, pDIY-eG y pTREX-Omni. pGEM T Easy (Fig. A1A) es un plásmido de clonado pre-linealizado en su sitio EcoRV, con una timina protruyente en cada extremo 3' que genera un sitio de inserción para los productos de PCR de polimerasas que dejan adeninas 3' protruyentes (como la Taq). Posee el MCS dentro del gen LacZ, permitiendo la selección de colonias recombinantes mediante *screening* blanco/azul (a través de la adición de X-gal al medio de cultivo). La selección de bacterias transformantes puede realizarse utilizando ampicilina (AmpR). pET28a(+) (Fig. A1B) es un plásmido de clonación y expresión de proteínas recombinantes que contiene al promotor T7 y al operador lac, los cuales controlan la expresión de la proteína de interés mediante la adición de IPTG, el cual bloquea al represor del operón lac, lacI, permitiendo la expresión de la ARN polimerasa T7, que se une al promotor T7 e induce la expresión de la proteína recombinante. Posee una configuración His-Tag N-terminal/trombina/T7 Tag y una secuencia His-Tag C-terminal opcional. En este caso, la selección puede realizarse utilizando kanamicina (KanR). pGEX-2T (Fig. A1C) es un plásmido de clonado y expresión de proteínas recombinantes con fusión a GST en su N-terminal, inducible por IPTG. La selección bacteriana puede realizarse

Construcciones para la expresión recombinante de distintas regiones de TolT-B como fusión a GST

Se amplificaron por PCR distintas regiones de TolT-B a partir de pET-28a(+) + TolT-B Q61-A260. Para esto se utilizaron los pares de oligonucleótidos BFW1-BRV1, BFW2-BRV2, BFW1-BRV2 y BFW3-BRV3 (detalle en Tabla S2) para los fragmentos 61-103, 97-162, 61-162 y 155-260, respectivamente. Todos estos poseen los sitios de restricción BamHI y EcoRI, respectivamente, con los que luego se clonó direccionalmente en el plásmido pGEX-2T, que provee una fusión traduccional al N-terminal con una etiqueta de GST.

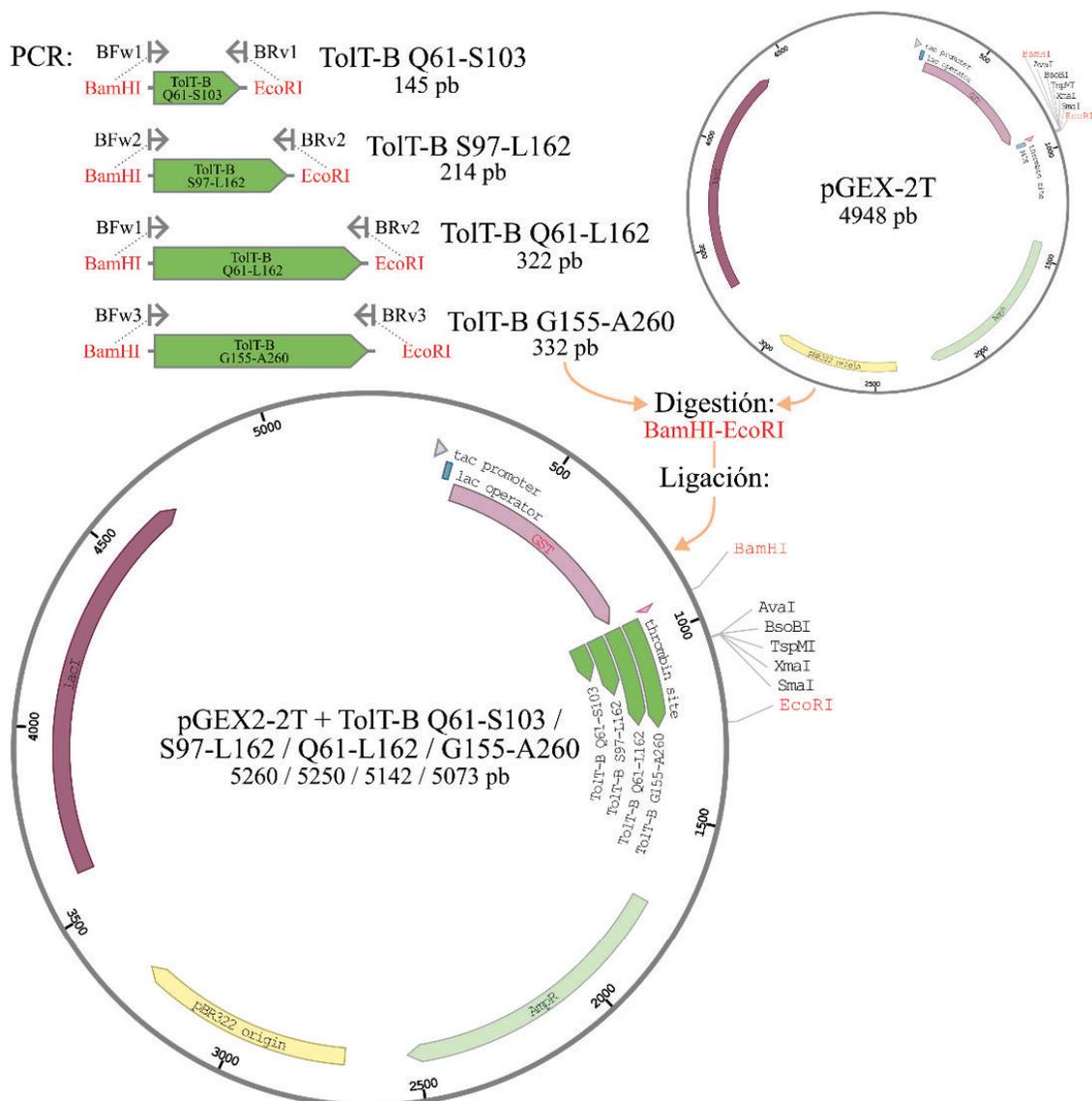


Figura A3: Construcciones para la expresión recombinante de distintas regiones de TolT-B como fusión a GST. Esquema donde se representa como los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos BFW1-BRV1, BFW2-BRV2, BFW1-BRV2 y BFW3-BRV3 son ligados al plásmido pGEX-2T tras ser digerido con las enzimas BamHI-EcoRI.

Construcciones para la expresión recombinante de una región de TolT-A y B como fusión a 6xHis

Por un lado, se amplificaron por PCR convencional distintas regiones de TolT-A y -B y, por otro, se generaron las modificaciones necesarias mediante SOEing PCR. En primer lugar se obtuvieron, a partir de ADNg de la cepa CL Brener, las secuencias completas de TolT-A y -B utilizando los oligonucleótidos ANtFw-B/ACtRv y BNtFw-B/ACtRv, respectivamente. Luego, usando estos productos como molde, se llevaron a cabo 4 reacciones de PCR: i) ASOEingFw2-ASOEingRv1 y BSOEingFw2-BSOEingRv1 para obtener las secuencias sin modificaciones (WT), ii) ASOEingFw1-ASOEingRv1 y BSOEingFw1-BSOEingRv1, para obtener las secuencias con la primer Cys modificada (C75/71S), iii) ASOEingFw2-ASOEingRv2 y BSOEingFw2-BSOEingRv2, para obtener secuencias parciales con la segunda Cys modificada (parte 1, p1) y iv) ASOEingFw3-ASOEingRv1 y BSOEingFw3-BSOEingRv1, para obtener secuencias parciales con la segunda Cys modificada (parte 2, p2). La mezcla de los productos obtenidos en iii y iv, los cuales poseen secuencias que se solapan hacia el final del primero y principio del segundo, se utilizaron como molde en otra reacción de PCR (v) (SOEing PCR) con lo oligonucleótidos ASOEingFw2-ASOEingRv1 y BSOEingFw2-BSOEingRv1 obteniéndose productos que resultan de la unión de los anteriores, con su segunda Cys modificada (C127/123S). Por último se llevó a cabo una reacción de PCR (vi) sobre estos, utilizando los oligonucleótidos ASOEingFw1-ASOEingRv1 y BSOEingFw1-BSOEingRv1, con los que se generó la modificación adicional de la primera Cys (C75/71S y C127/123S). Todos los oligonucleótidos *forward* (fw) y *reverse* (rv) utilizados poseen los sitios de restricción BamHI y XhoI, respectivamente, con los que posteriormente se clonó direccionalmente en el plásmido pET-28a, que provee una fusión traduccional al N-terminal con una etiqueta de 6xHis.

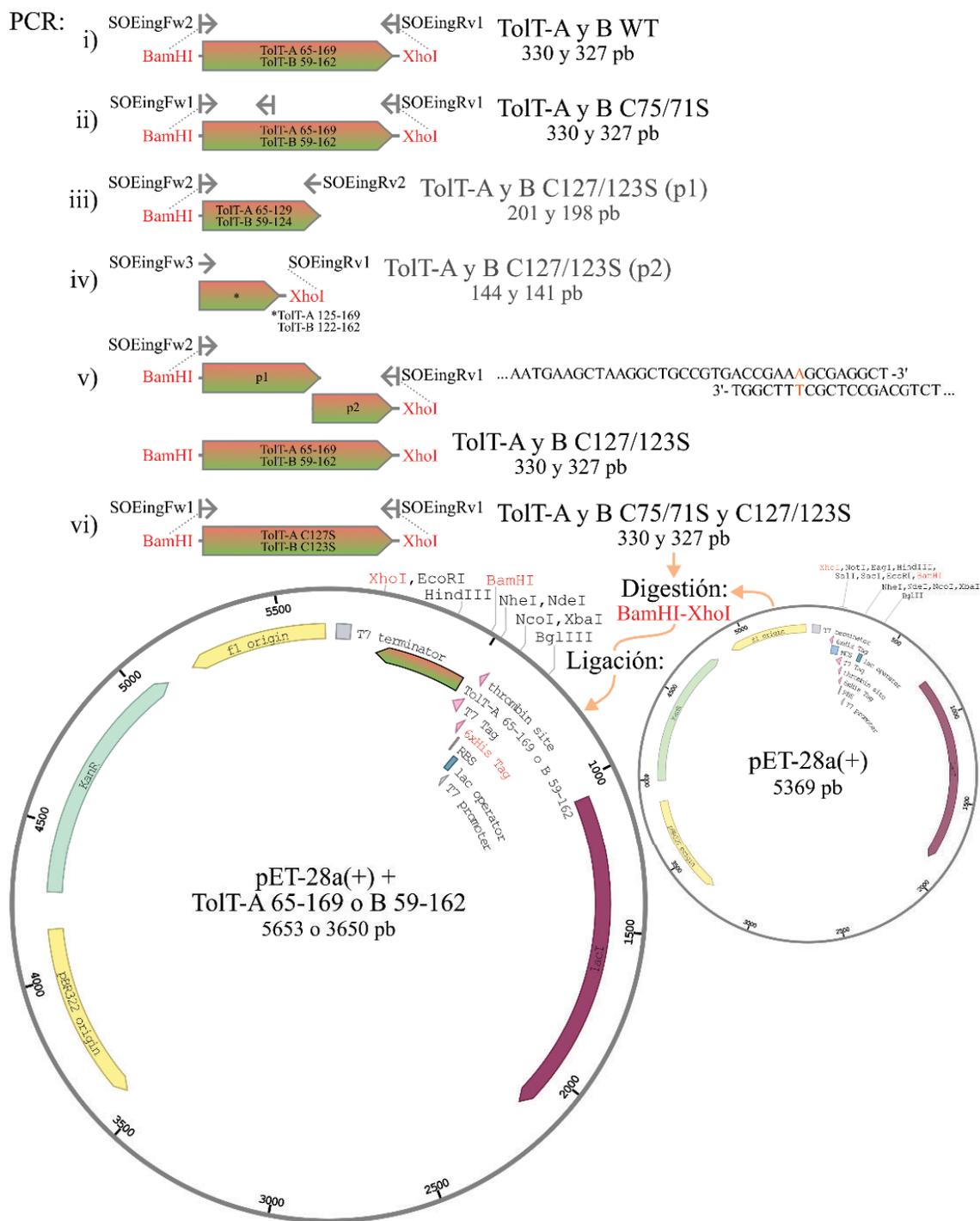


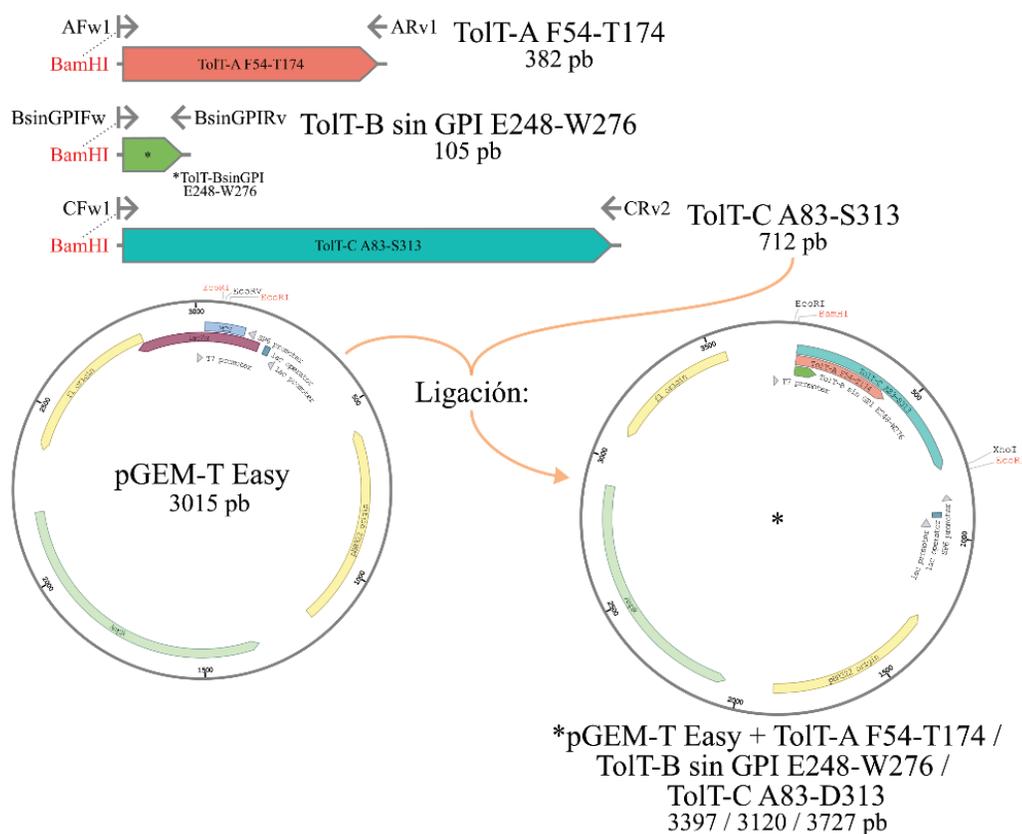
Figura A4: Construcciones para la expresión recombinante de una región de TolT-A y -B como fusión a 6xHis. Esquema donde se representan los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos SOEingFw2-SOEingRv1 (i), SOEingFw1-SOEingRv1 (ii), SOEingFw2-SOEingRv2 (iii) y SOEingFw3-SOEingRv1 (iv) sobre las secuencias completas de TolT-A y -B, así como también los de SOEingFw2-SOEingRv1 (v) sobre la mezcla de los productos de (iii) y (iv) y SOEingFw1-SOEingRv1 (vi) sobre el producto de (v). Los productos finales (i, ii, v y vi) fueron, junto con el plásmido pET-28a(+), posteriormente digeridos con las enzimas BamHI-XhoI y ligados a este.

Construcciones para la expresión recombinante de las distintas TolT como fusión a GST para la generación de antisueros

Excepto para las TolT-B canónicas, para quienes se utilizan las construcciones TolT-B Q61-S103 y G155-A260 ya generadas (Fig. A3), para TolT-A, -B sin GPI y -C se utilizó la técnica de PCR para amplificar regiones diferenciales entre ellas. Para esto se utilizó la secuencia completa de TolT-A descrita anteriormente o ADN_g de la cepa CL Brener como templado y los pares de oligonucleótidos AFw-ARv, BsinGPIFw-BsinGPIRv y CFw-CRv (detalle en Tabla S2), según corresponda. El clonado direccional en el plásmido pGEM-2T se llevó a cabo usando el sitio BamHI presente en los oligonucleótidos *fw* junto con el sitio EcoRI aportado por el plásmido pGEM-T Easy en el cual se clonaron todos los productos de PCR.

A

PCR:



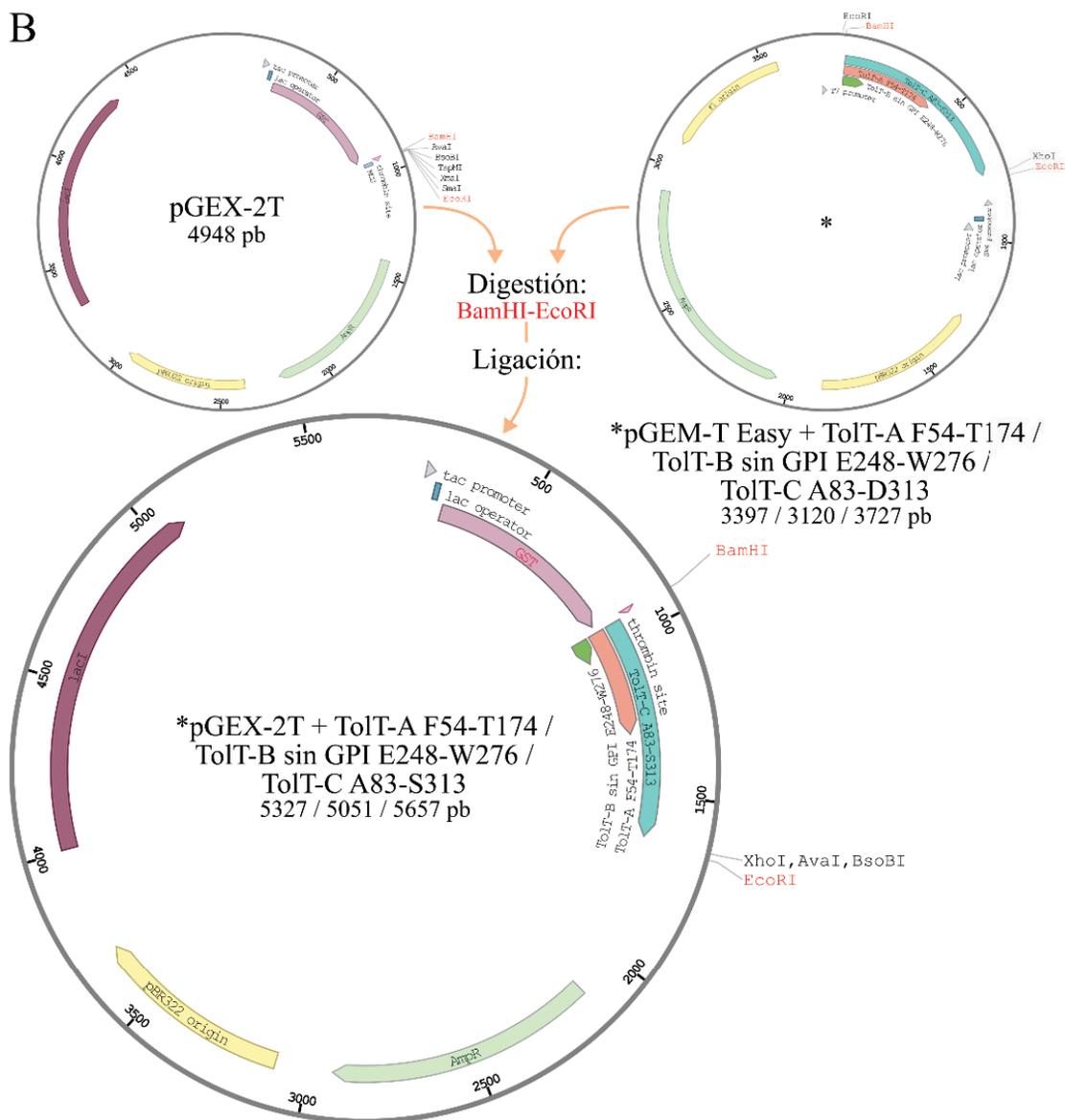


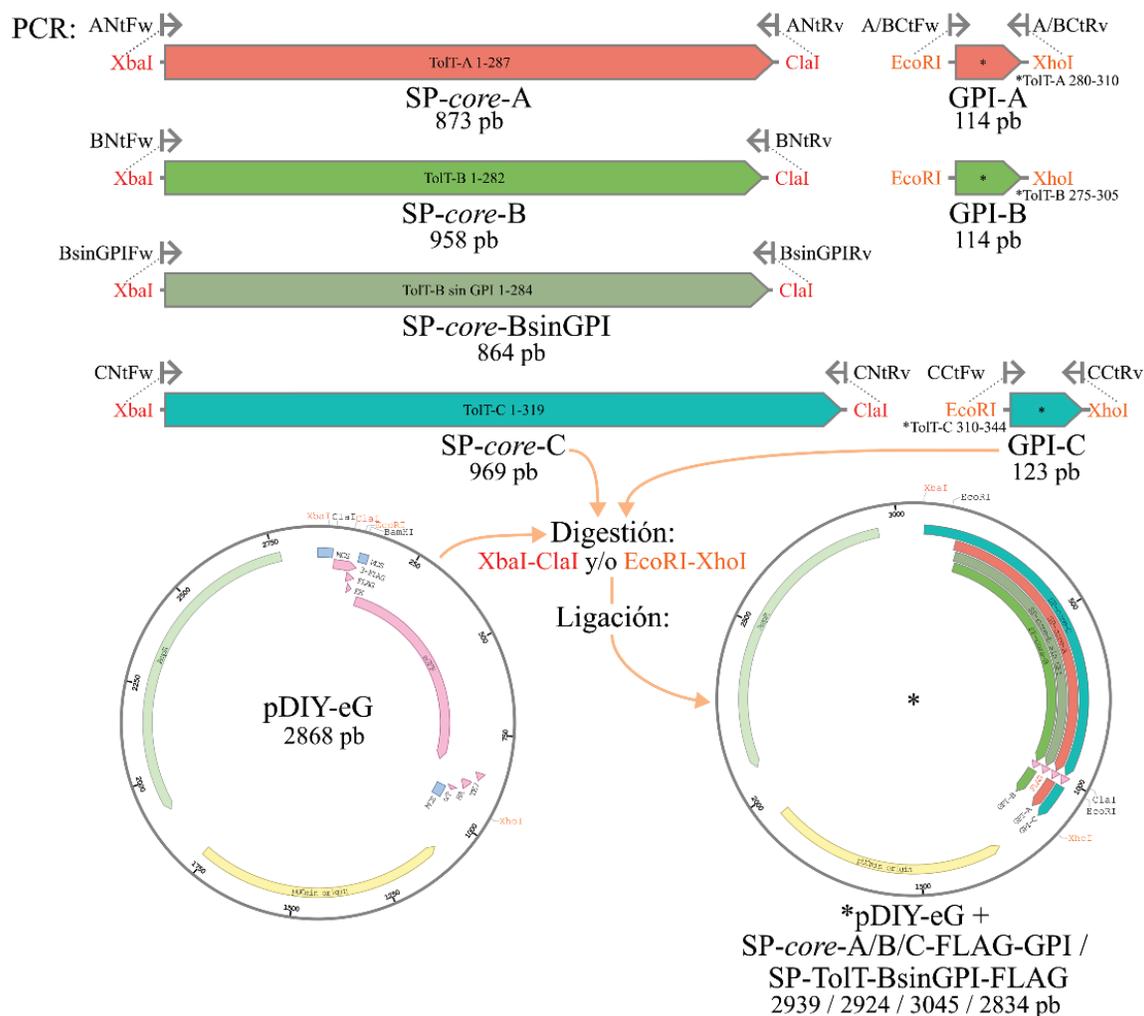
Figura A5: Construcciones para la expresión recombinante de las distintas TolT como fusión a GST. Esquema donde se representa como los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos AFw1-ARv1, BsinGPIFw-BsinGPIRv y CFw1-CRv2 son ligados al plásmido pGEM-T Easy (A). Posteriormente estas construcciones, junto al vector pGEX-2T, fueron digeridas con las enzimas BamHI-EcoRI y los productos ligados a este (B).

Construcciones para la sobre-expresión de TolT como fusión a FLAG

En primer lugar se obtuvieron, mediante PCR sobre ADN_g de la cepa CL Brener, las secuencias completas de TolT-B sin GPI y C utilizando los oligonucleótidos BsinGPIfullFw-BsinGPIfullRv y CNTFw-CCtRv (detalle en Tabla S2), respectivamente. Las secuencias completas de TolT-A y -B ya se habían obtenido previamente utilizando los oligonucleótidos ANtFw-B/ACTRv y BNtFw-B/ACTRv, respectivamente. A continuación,

utilizando estos productos como molde, se amplificaron para TolT-A, -B y -C, también por PCR, 2 regiones, la primera que corresponde a aquella que se encuentra río arriba de la secuencia consenso para la adición de GPI (SP-core) y la segunda que corresponde a la que se encuentra río abajo del mismo (GPI). Esto se consiguió utilizando los oligonucleótidos ANtFw-ANtRv, BNtFw-BNtRv y CNtFw-CNtRv, para la primera, y B/ACtFw-B/ACtRv y CCtFw-CCtRv (detalle en Tabla S2), para la segunda. Cada uno de estos productos se clonó direccionalmente en el plásmido intermediario pDIY-eG (GenBank Accession Number JN596089) [156] utilizando los sitios de restricción XbaI-ClaI y EcoRI-XhoI presente en los distintos pares de oligonucleótidos. Dada la disposición de estos sitios en el plásmido, este clonado resulta en la secuencia SP-TolT de cada TolT seguida de un epítipo FLAG y luego de la secuencia GPI. Esta región se subclonó de forma direccionada en el plásmido pTREX-Omni con las enzimas de restricción XbaI-XhoI, cuyas posiciones permiten la delección de la secuencia de GFP presente en el plásmido original.

A



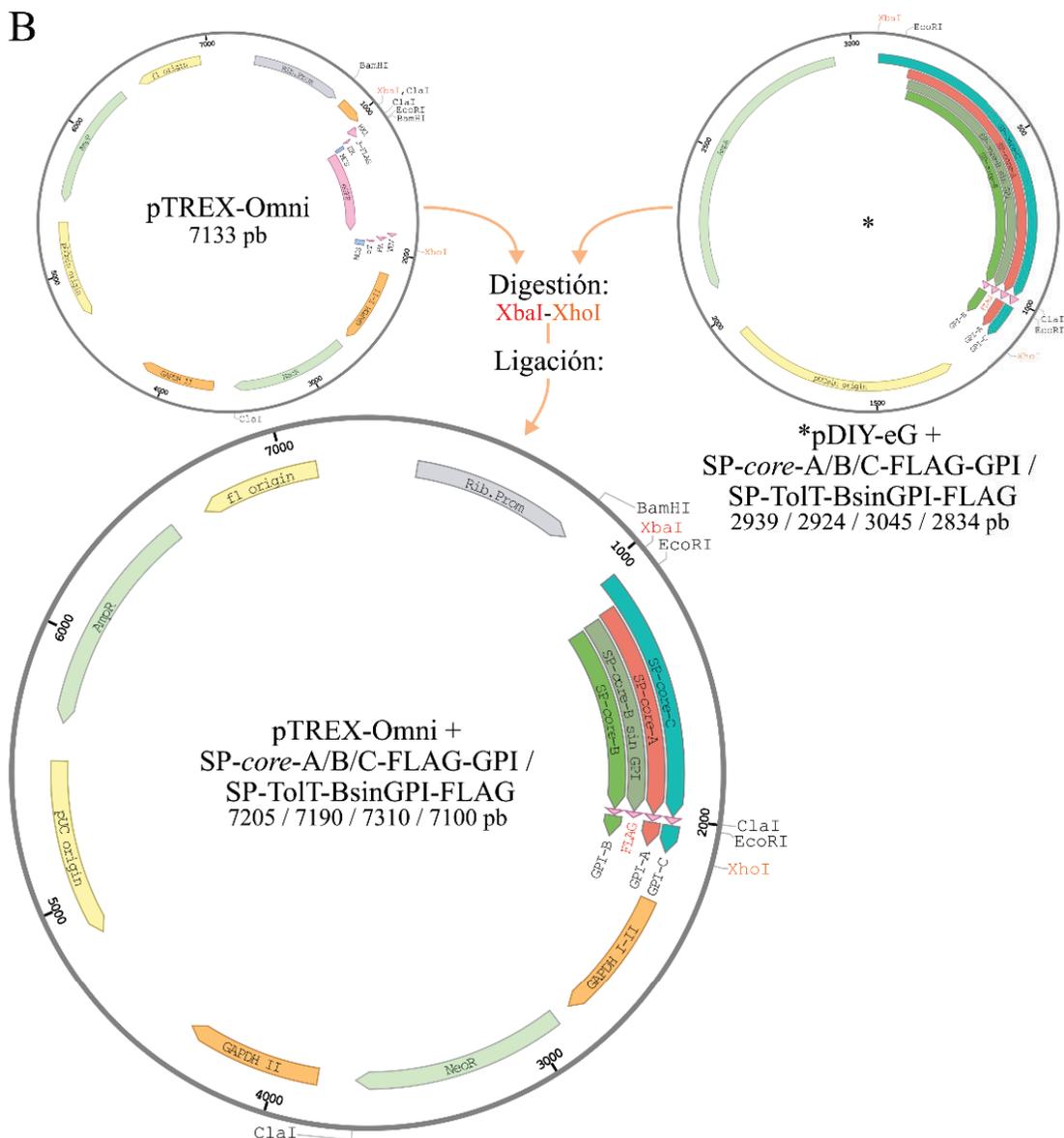
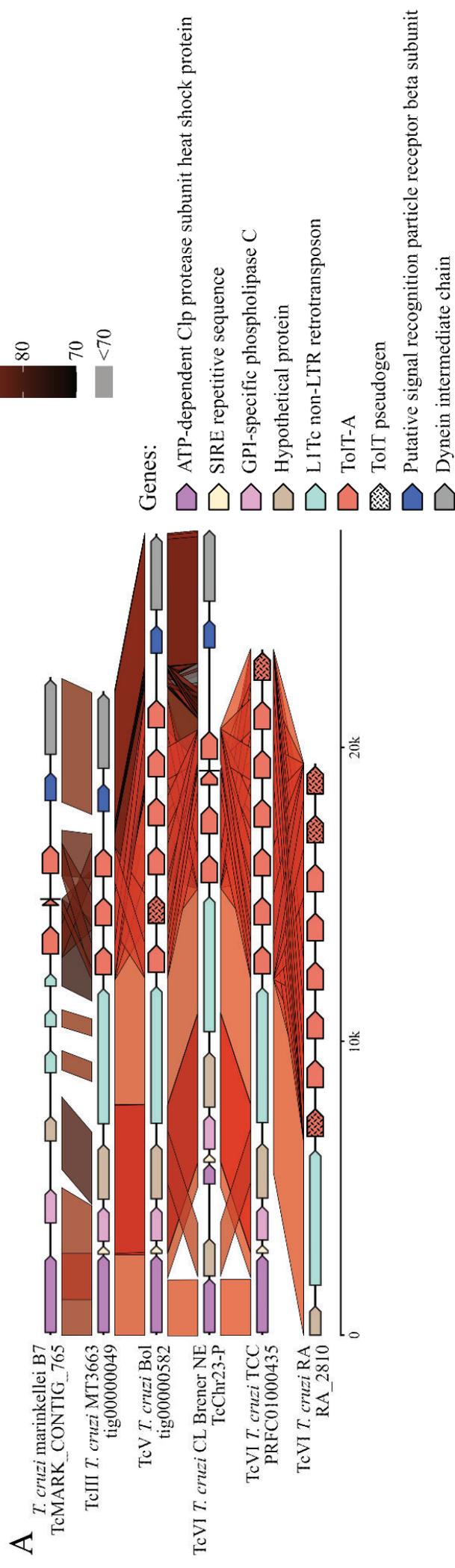
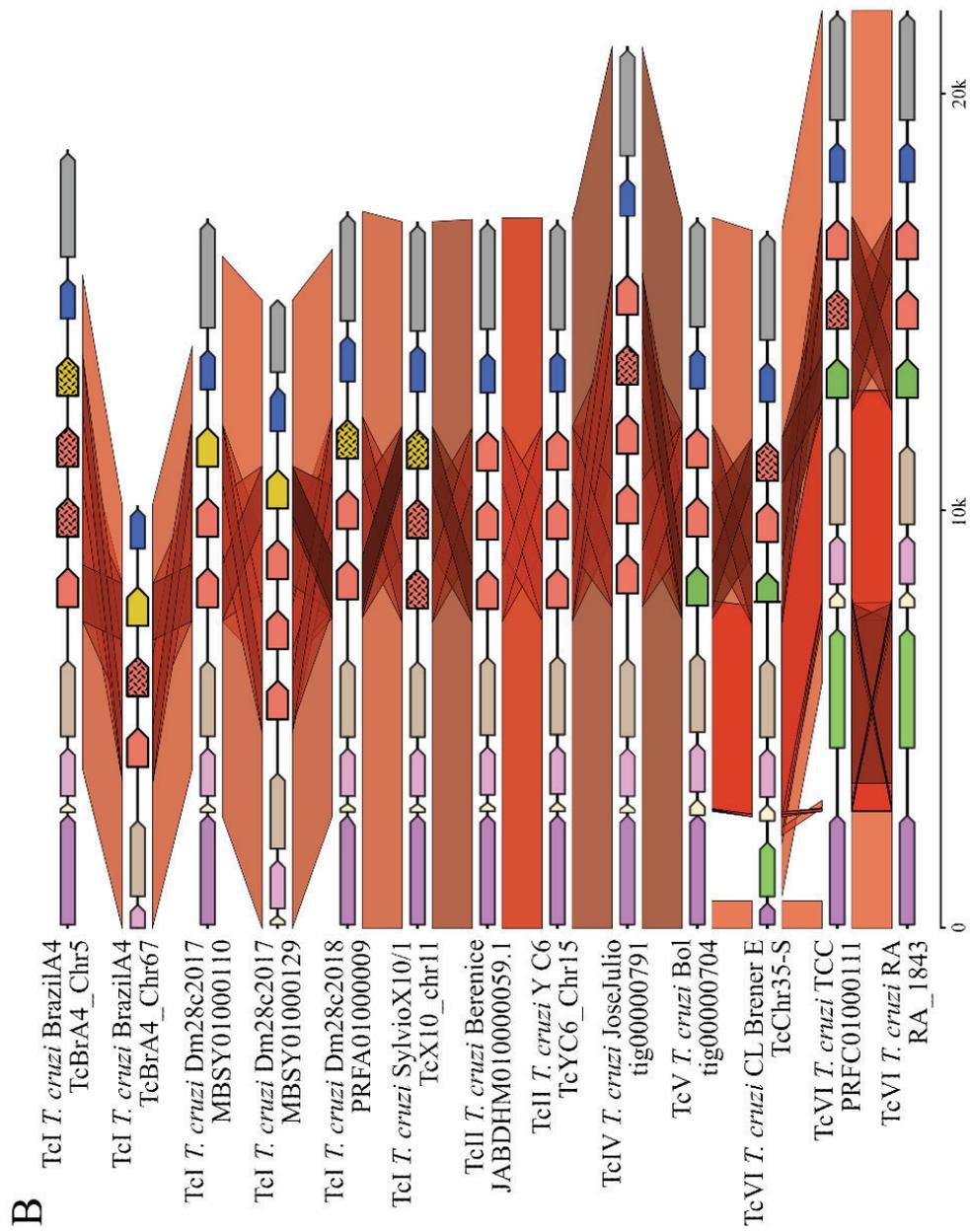


Figura A6: Construcciones para la sobre-expresión de TolT como fusión a FLAG. Esquema donde se representa como los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos ANtFw-ANtRv, ACtFw-ACtRv, BNtFw-BNtRv, BCtFw-BCtRv, BsinGPIFw-BsinGPIRv, CNTfW-CNTRv y Bct-Fw-BCtRv fueron digeridos con las enzimas XbaI-ClaI o EcoRI-XhoI, según corresponda, y ligados al plásmido pDIY-eG también digerido (A). Posteriormente estas construcciones, junto al plásmido pTREX-Omni, fueron digeridas con las enzimas XbaI-XhoI y los productos ligados a este (B).

Figuras suplementarias





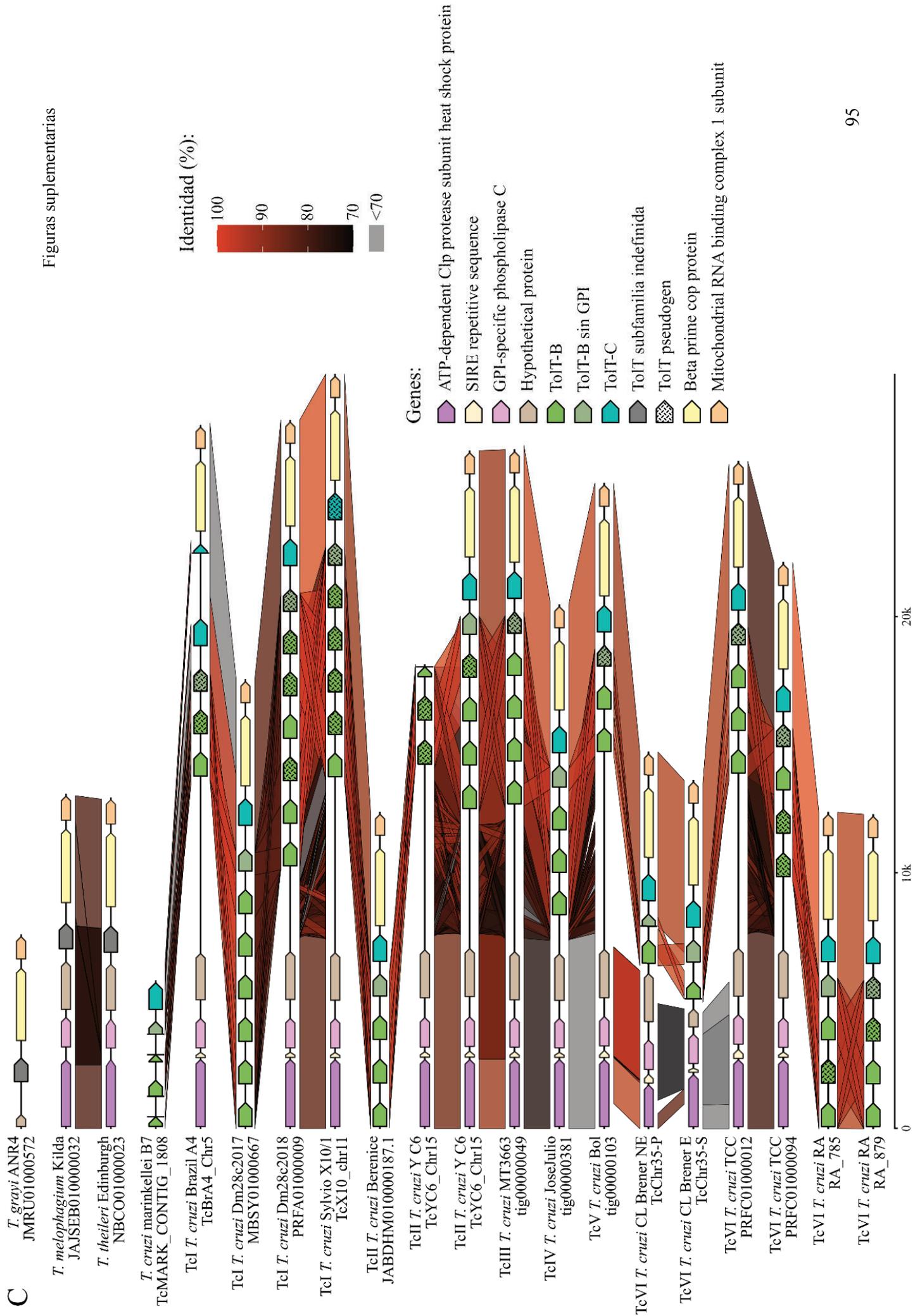


Figura S1: Sintenia de los genes TolT. Se esquematizan las regiones genómicas conteniendo los genes TolT identificados en *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *T. grayi*, *T. melophagium* y *T. theileri* definidas como cluster 1 (A), 2 (B) y 3 (C). En todos los casos se indican los genes TolT y los marcadores posicionales utilizados en colores de acuerdo a las referencias. El nivel de identidad (%) entre las secuencias se representa por enlaces en la gama del rojo (100%) al negro (70%) o en gris (<70%). Los genes de TolT truncados se indican con una línea vertical donde corresponde. Los contigs fueron editados para la correcta visualización de los genes de interés. La escala indica la distancia en nt.

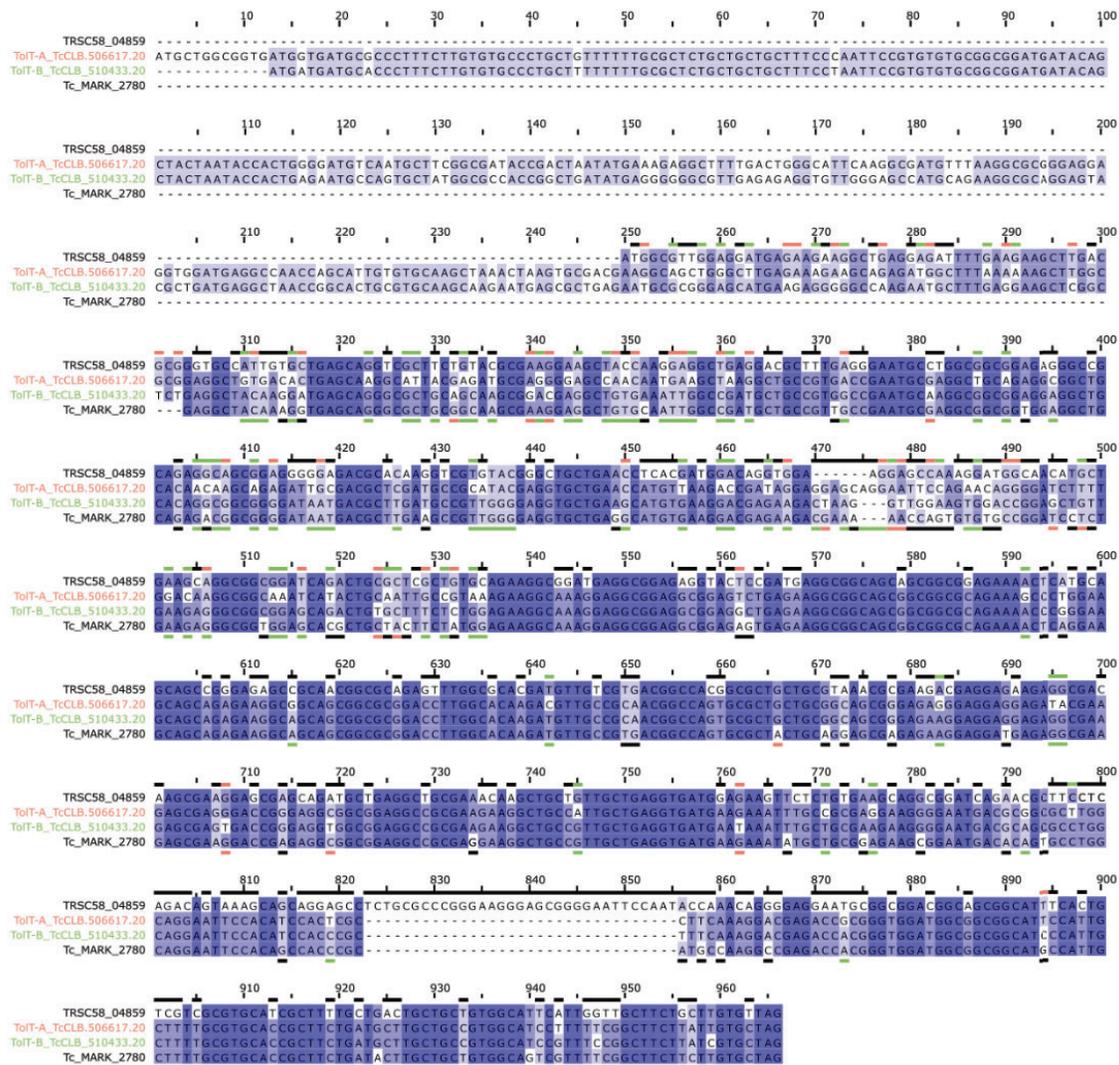


Figura S2: Secuencias TolT sin asignación. Alineamiento de secuencias de ADN de TRSC_04859 y Tc_MARK_2780 con secuencias de referencia TolT-A (TcCLB.506617.20) y TolT-B (TcCLB.510433.20). Los nt fueron coloreados según el porcentaje de identidad. Por arriba y/o debajo se indican los polimorfismos según haya coincidencia con TolT-A (rojo), -B (verde) o ninguno (negro).

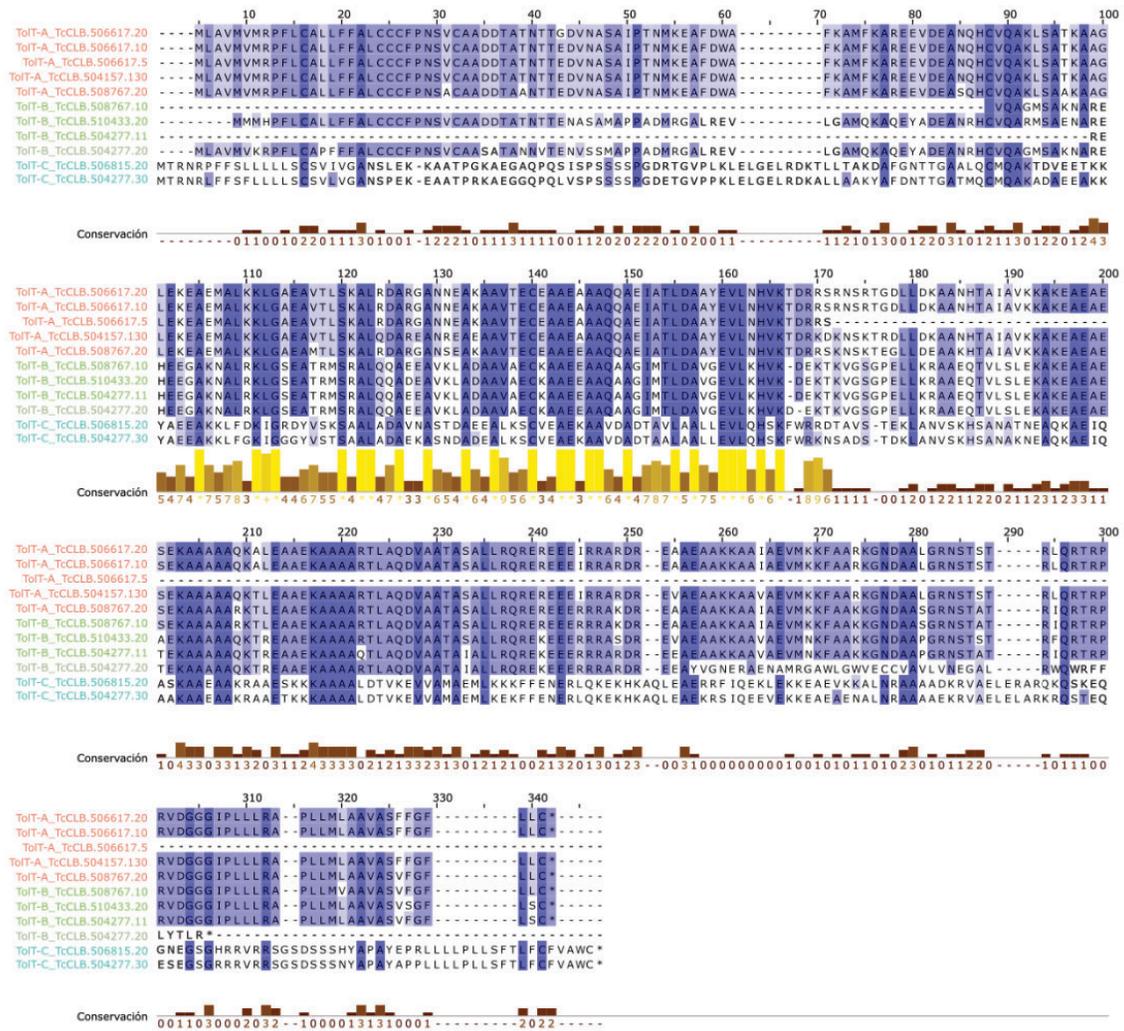


Figura S3: Productos ToIT de la cepa CL Brener de *T. cruzi*. Alineamiento de secuencias de aa de todas las secuencias ToIT de la cepa CL Brener, anotadas en TriTrypDB, coloreado según el porcentaje de identidad. Se representa en barras amarillas/marrones el grado de conservación.

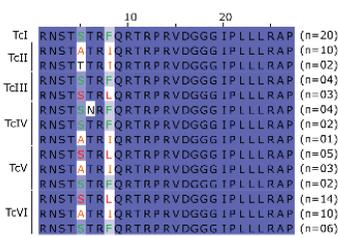


Figura S4: Polimorfismos del epítipo A3/B3 entre las DTUs de *T. cruzi*. Alineamiento de secuencias del epítipo A3/B3 de ToIT-A y -B, respectivamente, representativas para cada DTU (TcI-VI). Se diferencian con colores sus distintas variantes: STRF (verde), STRL (rojo) y ATRI (naranja). Los residuos fueron coloreados según el porcentaje de identidad. A la derecha se indica el número de secuencias para cada variante de cada DTU.

Bibliografía

1. Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006;22: 168–174.
2. Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96: 397–402.
3. Buscaglia CA, Kissinger JC, Agüero F. Neglected Tropical Diseases in the Post-Genomic Era. *Trends Genet.* 2015;31: 539–555.
4. Jackson AP. Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology.* 2015;142 Suppl 1: S40–56.
5. Berná L, Rodriguez M, Chiribao ML, Parodi-Talice A, Pita S, Rijo G, et al. Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microb Genom.* 2018;4. doi:10.1099/mgen.0.000177
6. Figueiredo LM, Cross GAM, Janzen CJ. Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7: 504–513.
7. De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 2002;8: 269–285.
8. Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell.* 1990;61: 1157–1160.
9. Matthews KR, Tschudi C, Ullu E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* 1994;8: 491–501.
10. Michaeli S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol.* 2011;6: 459–474.
11. Sutton RE, Boothroyd JC. Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell.* 1986;47: 527–535.
12. Pereira-Chiocola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, Rodrigues MM, et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 7): 1299–1307.
13. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). [cited 20 Mar 2024]. Available: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
14. Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5: 400–419.
15. Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101: 463–491.
16. Pinazo M-J, Espinosa G, Cortes-Lletget C, Posada E de J, Aldasoro E, Oliveira I, et al. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7: e1965.
17. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet.* 2018;391: 82–94.
18. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010;115: 14–21.
19. Caradonna KL, Burleigh BA. Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol.* 2011;76: 33–61.
20. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 2001;31: 472–481.
21. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision

- meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104: 1051–1054.
22. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10: e0004792.
 23. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1: 429–432.
 24. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. Int J Parasitol. 1998;28: 85–104.
 25. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol. 2000;30: 35–44.
 26. Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int J Parasitol. 2001;31: 1218–1226.
 27. Tomazi L, Kawashita SY, Pereira PM, Zingales B, Briones MRS. Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. Genet Mol Res. 2009;8: 458–476.
 28. de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog. 2006;2: e24.
 29. Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Genetics. 2005;171: 527–543.
 30. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology. 2009;136: 641–655.
 31. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop. 2015;151: 166–177.
 32. Barnabé C, Mobarec HI, Jurado MR, Cortez JA, Brenière SF. Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. Infect Genet Evol. 2016;39: 176–186.
 33. Herreros-Cabello A, Callejas-Hernández F, Gironès N, Fresno M. *Trypanosoma Cruzi* Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. Genes . 2020;11. doi:10.3390/genes11101196
 34. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012;12: 240–253.
 35. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1987;81: 755–759.
 36. Sánchez-Guillén M del C, Barnabé C, Tibayrenc M, Zavala-Castro J, Totolhua J-L, Méndez-López J, et al. *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101: 585–590.
 37. Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. Parasitology. 2000;120 (Pt 5): 513–526.

38. Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Adv Parasitol.* 2017;97: 1–45.
39. Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, et al. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 2009;5: e1000410.
40. Macchiaverna NP, Enriquez GF, Buscaglia CA, Balouz V, Gürtler RE, Cardinal MV. New human isolates of *Trypanosoma cruzi* confirm the predominance of hybrid lineages in domestic transmission cycle of the Argentinean Chaco. *Infect Genet Evol.* 2018;66: 229–235.
41. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 2005;309: 409–415.
42. Franzén O, Talavera-López C, Ochaya S, Butler CE, Messenger LA, Lewis MD, et al. Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*. *BMC Genomics.* 2012;13: 531.
43. Stoco PH, Wagner G, Talavera-Lopez C, Gerber A, Zaha A, Thompson CE, et al. Genome of the avirulent human-infective trypanosome--*Trypanosoma rangeli*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8: e3176.
44. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science.* 2005;309: 416–422.
45. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.* 2005;309: 436–442.
46. Callejas-Hernández F, Rastrojo A, Poveda C, Gironès N, Fresno M. Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. *Sci Rep.* 2018;8: 14631.
47. Franzén O, Ochaya S, Sherwood E, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, et al. Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5: e984.
48. Bradwell KR, Koparde VN, Matveyev AV, Serrano MG, Alves JMP, Parikh H, et al. Genomic comparison of *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* to *Trypanosoma cruzi* strains of high and low virulence. *BMC Genomics.* 2018;19: 770.
49. Grisard EC, Teixeira SMR, de Almeida LGP, Stoco PH, Gerber AL, Talavera-López C, et al. *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome Announc.* 2014;2. doi:10.1128/genomeA.01114-13
50. Díaz-Viraqué F, Pita S, Greif G, de Souza R de CM, Iraola G, Robello C. Nanopore Sequencing Significantly Improves Genome Assembly of the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. *Genome Biol Evol.* 2019;11: 1952–1957.
51. Wang W, Peng D, Baptista RP, Li Y, Kissinger JC, Tarleton RL. Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *PLoS Pathog.* 2021;17: e1009254.
52. Hoyos Sanchez MC, Ospina Zapata HS, Suarez BD, Ospina C, Barbosa HJ, Carranza Martinez JC, et al. A phased genome assembly of a Colombian *Trypanosoma cruzi* TcI strain and the evolution of gene families. *Sci Rep.* 2024;14: 2054.
53. Balouz V, Bracco L, Ricci AD, Romer G, Agüero F, Buscaglia CA. Serological Approaches for *Trypanosoma cruzi* Strain Typing. *Trends Parasitol.* 2021;37: 214–225.
54. Bartholomeu DC, Cerqueira GC, Leão ACA, daRocha WD, Pais FS, Macedo C, et al. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:

- 3407–3417.
55. Campetella O, Buscaglia CA, Mucci J, Leguizamón MS. Parasite-host glycan interactions during *Trypanosoma cruzi* infection: trans-Sialidase rides the show. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866: 165692.
 56. Berná L, Chiribao ML, Pita S, Alvarez-Valin F, Parodi-Talice A. Exploring the Genomic Landscape of the GP63 family in *Trypanosoma cruzi*: Evolutionary Dynamics and Functional Peculiarities. *bioRxiv.* 2024. p. 2024.02.17.580826. doi:10.1101/2024.02.17.580826
 57. Carmo MS, Santos MR, Cummings LM, Araya JE, Yamauchi LM, Yoshida N, et al. Isolation and characterisation of genomic and cDNA clones coding for a serine-, alanine-, and proline-rich protein of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 2001;31: 259–264.
 58. Bernabó G, Levy G, Ziliani M, Caeiro LD, Sánchez DO, Tekiel V. TcTASV-C, a protein family in *Trypanosoma cruzi* that is predominantly trypomastigote-stage specific and secreted to the medium. *PLoS One.* 2013;8: e71192.
 59. Lander N, Bernal C, Diez N, Añez N, Docampo R, Ramírez JL. Localization and developmental regulation of a dispersed gene family 1 protein in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2010;78: 231–240.
 60. Bernardo WP, Souza RT, Costa-Martins AG, Ferreira ER, Mortara RA, Teixeira MMG, et al. Genomic Organization and Generation of Genetic Variability in the RHS (Retrotransposon Hot Spot) Protein Multigene Family in *Trypanosoma cruzi*. *Genes .* 2020;11. doi:10.3390/genes11091085
 61. Pech-Canul Á de la C, Monteón V, Solís-Oviedo R-L. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res.* 2017;2017: 3751403.
 62. Rodríguez HO, Guerrero NA, Fortes A, Santi-Rocca J, Gironès N, Fresno M. *Trypanosoma cruzi* strains cause different myocarditis patterns in infected mice. *Acta Trop.* 2014;139: 57–66.
 63. Santi-Rocca J, Fernandez-Cortes F, Chillón-Marinas C, González-Rubio M-L, Martin D, Gironès N, et al. A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. *Sci Rep.* 2017;7: 8893.
 64. Poveda C, Herreros-Cabello A, Callejas-Hernández F, Osuna-Pérez J, Maza MC, Chillón-Marinas C, et al. Interaction of Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family 1 (SLAMF1) receptor with *Trypanosoma cruzi* is strain-dependent and affects NADPH oxidase expression and activity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14: e0008608.
 65. de Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol.* 1984;86: 197–283.
 66. Field MC, Carrington M. The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7: 775–786.
 67. Sunter JD, Gull K. The Flagellum Attachment Zone: “The Cellular Ruler” of Trypanosome Morphology. *Trends Parasitol.* 2016;32: 309–324.
 68. Kohl L, Robinson D, Bastin P. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J.* 2003;22: 5336–5346.
 69. Tetley L, Vickerman K. Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat. *J Cell Sci.* 1985;74: 1–19.
 70. Cámara M de LM, Balouz V, Centeno Cameán C, Cori CR, Kashiwagi GA, Gil SA, et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins are involved in the attachment to the *Triatoma infestans* rectal ampoule. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13: e0007418.
 71. Gonzalez MS, Souza MS, Garcia ES, Nogueira NFS, Mello CB, Cánepa GE, et al. *Trypanosoma cruzi* TcSMUG L-surface mucins promote development and infectivity in

- the triatomine vector *Rhodnius prolixus*. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7: e2552.
72. Robinson DR, Gull K. Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. Nature. 1991;352: 731–733.
 73. Moreira-Leite FF, Sherwin T, Kohl L, Gull K. A trypanosome structure involved in transmitting cytoplasmic information during cell division. Science. 2001;294: 610–612.
 74. Paulin JJ, Keith CH, Tarleton RL. A monoclonal antibody to alpha tubulin recognizes host cell and *Trypanosoma cruzi* tubulins. J Protozool. 1988;35: 123–129.
 75. Saborio JL, Wrightsman RA, Kazuko SG, Granger BS, Manning JE. *Trypanosoma cruzi*: identification of a surface antigen restricted to the flagellar region of the infective form of the parasite. Exp Parasitol. 1990;70: 411–418.
 76. Segura EL, Vazquez C, Bronzina A, Campos JM, Cerisola JA, Cappa SM. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. II. Flagellar and membrane fraction. J Protozool. 1977;24: 540–543.
 77. Van Voorhis WC, Eisen H. Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. J Exp Med. 1989;169: 641–652.
 78. Quanquin NM, Galaviz C, Fouts DL, Wrightsman RA, Manning JE. Immunization of mice with a Tola-like surface protein of *Trypanosoma cruzi* generates CD4(+) T-cell-dependent parasitocidal activity. Infect Immun. 1999;67: 4603–4612.
 79. Williams-Jones DP, Webby MN, Cara E. Press, Gradon JM, Armstrong SR, Szczepaniak J, et al. Tunable force transduction through the *Escherichia coli* cell envelope. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023;120. doi:10.1073/pnas.2306707120
 80. Levengood SK, Beyer WF Jr, Webster RE. Tola: a membrane protein involved in colicin uptake contains an extended helical region. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88: 5939–5943.
 81. Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, Minning T, et al. High throughput selection of effective serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2: e316.
 82. Hartley AN, Cooley G, Gwyn S, Orozco MM, Tarleton RL. Frequency of IFN γ -producing T cells correlates with seroreactivity and activated T cells during canine *Trypanosoma cruzi* infection. Vet Res. 2014;45: 6.
 83. Brunoro GVF, Caminha MA, Ferreira AT da S, Leprevost F da V, Carvalho PC, Perales J, et al. Reevaluating the *Trypanosoma cruzi* proteomic map: The shotgun description of bloodstream trypomastigotes. J Proteomics. 2015;115: 58–65.
 84. Castro Eiro MD, Alvarez MG, Cooley G, Viotti RJ, Bertocchi GL, Lococo B, et al. The Significance of Discordant Serology in Chagas Disease: Enhanced T-Cell Immunity to *Trypanosoma cruzi* in Serodiscordant Subjects. Front Immunol. 2017;8: 1141.
 85. Padilla AM, Wang W, Akama T, Carter DS, Easom E, Freund Y, et al. Discovery of an orally active benzoxaborole prodrug effective in the treatment of Chagas disease in non-human primates. Nat Microbiol. 2022;7: 1536–1546.
 86. Bustamante JM, White BE, Wilkerson GK, Hodo CL, Auckland LD, Wang W, et al. Frequency variation and dose modification of benznidazole administration for the treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in mice, dogs and non-human primates. bioRxiv. 2023. doi:10.1101/2023.02.01.526739
 87. Nakayasu ES, Sobreira TJP, Torres R Jr, Ganiko L, Oliveira PSL, Marques AF, et al. Improved proteomic approach for the discovery of potential vaccine targets in *Trypanosoma cruzi*. J Proteome Res. 2012;11: 237–246.
 88. Lantos AB, Carlevaro G, Araoz B, Ruiz Diaz P, Camara M de LM, Buscaglia CA, et al. Sialic Acid Glycobiology Unveils *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Membrane Physiology. PLoS Pathog. 2016;12: e1005559.
 89. Nogueira PM, Ribeiro K, Silveira ACO, Campos JH, Martins-Filho OA, Bela SR, et al.

- Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J Extracell Vesicles*. 2015;4: 28734.
90. Ribeiro KS, Vasconcellos CI, Soares RP, Mendes MT, Ellis CC, Aguilera-Flores M, et al. Proteomic analysis reveals different composition of extracellular vesicles released by two *Trypanosoma cruzi* strains associated with their distinct interaction with host cells. *J Extracell Vesicles*. 2018;7: 1463779.
 91. Nakayasu ES, Yashunsky DV, Nohara LL, Torrecilhas ACT, Nikolaev AV, Almeida IC. GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Syst Biol*. 2009;5: 261.
 92. Bautista-López NL, Ndao M, Camargo FV, Nara T, Annoura T, Hardie DB, et al. Characterization and Diagnostic Application of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens Shed in Extracellular Vesicles Released from Infected Mammalian Cells. *J Clin Microbiol*. 2017;55: 744–758.
 93. Szempruch AJ, Sykes SE, Kieft R, Dennison L, Becker AC, Gartrell A, et al. Extracellular Vesicles from *Trypanosoma brucei* Mediate Virulence Factor Transfer and Cause Host Anemia. *Cell*. 2016;164: 246–257.
 94. Kochanowsky JA, Mira PM, Elikae S, Muratore K, Rai AK, Riestra AM, et al. *Trichomonas vaginalis* extracellular vesicles up-regulate and directly transfer adherence factors promoting host cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024;121: e2401159121.
 95. Dey S, Mohapatra S, Khokhar M, Hassan S, Pandey RK. Extracellular Vesicles in Malaria: Shedding Light on Pathogenic Depths. *ACS Infect Dis*. 2024;10: 827–844.
 96. Leandro de Jesus TC, Calderano SG, Vitorino FN de L, Llanos RP, Lopes M de C, de Araújo CB, et al. Quantitative Proteomic Analysis of Replicative and Nonreplicative Forms Reveals Important Insights into Chromatin Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16: 23–38.
 97. Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol*. 2003;2: 201–208.
 98. Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98: 435–442.
 99. Fermino BR, Paiva F, Viola LB, Rodrigues CMF, Garcia HA, Campaner M, et al. Shared species of crocodylian trypanosomes carried by tabanid flies in Africa and South America, including the description of a new species from caimans, *Trypanosoma kaiowa* n. sp. *Parasit Vectors*. 2019;12: 225.
 100. Lobo M, Balouz V, Melli L, Carlevaro G, Cortina ME, Cámara M de LM, et al. Molecular and antigenic characterization of *Trypanosoma cruzi* TolT proteins. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13: e0007245.
 101. Oldrieve GR, Malacart B, López-Vidal J, Matthews KR. The genomic basis of host and vector specificity in non-pathogenic trypanosomatids. *Biol Open*. 2022;11. doi:10.1242/bio.059237
 102. Mucci J, Lantos AB, Buscaglia CA, Leguizamón MS, Campetella O. The *Trypanosoma cruzi* Surface, a Nanoscale Patchwork Quilt. *Trends Parasitol*. 2017;33: 102–112.
 103. Cánepa GE, Mesías AC, Yu H, Chen X, Buscaglia CA. Structural features affecting trafficking, processing, and secretion of *Trypanosoma cruzi* mucins. *J Biol Chem*. 2012;287: 26365–26376.
 104. Buscaglia CA, Campo VA, Frasch ACC, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4: 229–236.

105. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596: 583–589.
106. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*. 2022;50: D439–D444.
107. Cánepa GE, Degese MS, Budu A, Garcia CRS, Buscaglia CA. Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Biochem J*. 2012;444: 211–218.
108. Cámara M de LM, Cánepa GE, Lantos AB, Balouz V, Yu H, Chen X, et al. The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) regulates *Trypanosoma cruzi* infectivity and differentiation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11: e0005856.
109. Urban I, Santurio LB, Chidichimo A, Yu H, Chen X, Mucci J, et al. Molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* TcSMUG family of mucin genes and proteins. *Biochem J*. 2011;438: 303–313.
110. Durante IM, Cámara M de LM, Buscaglia CA. A Novel *Trypanosoma cruzi* Protein Associated to the Flagellar Pocket of Replicative Stages and Involved in Parasite Growth. *PLoS One*. 2015;10: e0130099.
111. Chiari E, Marques de Araújo S, Carneiro M. Meios empobrecidos em nutrientes na diferenciação epimastigota-tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*. REUNIÃO ANUAL EM PESQUISA. 1980.
112. Carmona SJ, Nielsen M, Schafer-Nielsen C, Mucci J, Altchek J, Balouz V, et al. Towards High-throughput Immunomics for Infectious Diseases: Use of Next-generation Peptide Microarrays for Rapid Discovery and Mapping of Antigenic Determinants. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14: 1871–1884.
113. Ricci AD, Bracco L, Salas-Sarduy E, Ramsey JM, Nolan MS, Lynn MK, et al. The *Trypanosoma cruzi* Antigen and Epitope Atlas: antibody specificities in Chagas disease patients across the Americas. *Nat Commun*. 2023;14: 1850.
114. Durante IM, La Spina PE, Carmona SJ, Agüero F, Buscaglia CA. High-resolution profiling of linear B-cell epitopes from mucin-associated surface proteins (MASPs) of *Trypanosoma cruzi* during human infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11: e0005986.
115. Abraham M, Machado E, Alvarez-Valín F, de Miranda AB, Catanho M. Uncovering Pseudogenes and Intergenic Protein-coding Sequences in TriTryps' Genomes. *Genome Biol Evol*. 2022;14. doi:10.1093/gbe/evac142
116. Magri A, Galuppi R, Fioravanti M. Autochthonous *Trypanosoma* spp. in European Mammals: A Brief Journey amongst the Neglected Trypanosomes. *Pathogens*. 2021;10. doi:10.3390/pathogens10030334
117. Majeau A, Murphy L, Herrera C, Dumonteil E. Assessing *Trypanosoma cruzi* Parasite Diversity through Comparative Genomics: Implications for Disease Epidemiology and Diagnostics. *Pathogens*. 2021;10. doi:10.3390/pathogens10020212
118. Silvestrini MMA, Alessio GD, Frias BED, Sales Júnior PA, Araújo MSS, Silvestrini CMA, et al. New insights into *Trypanosoma cruzi* genetic diversity, and its influence on parasite biology and clinical outcomes. *Front Immunol*. 2024;15: 1342431.
119. Porrás AI, Yadon ZE, Altchek J, Britto C, Chaves GC, Flevaud L, et al. Target Product Profile (TPP) for Chagas Disease Point-of-Care Diagnosis and Assessment of Response to Treatment. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9: e0003697.
120. Schijman AG, Alonso-Padilla J, Britto C, Bernal CPH. Retrospect, advances and challenges in Chagas disease diagnosis: a comprehensive review. *The Lancet Regional Health – Americas*. 2024;36. doi:10.1016/j.lana.2024.100821
121. Conticello SG, Gilad Y, Avidan N, Ben-Asher E, Levy Z, Fainzilber M. Mechanisms

- for evolving hypervariability: the case of conopeptides. *Mol Biol Evol.* 2001;18: 120–131.
122. Alsmark C, Foster PG, Sicheritz-Ponten T, Nakjang S, Martin Embley T, Hirt RP. Patterns of prokaryotic lateral gene transfers affecting parasitic microbial eukaryotes. *Genome Biol.* 2013;14: R19.
 123. Silva DCF, Silva RC, Ferreira RC, Briones MRS. Examining marginal sequence similarities between bacterial type III secretion system components and *Trypanosoma cruzi* surface proteins: horizontal gene transfer or convergent evolution? *Front Genet.* 2013;4: 143.
 124. Caballero ZC, Costa-Martins AG, Ferreira RC, P Alves JM, Serrano MG, Camargo EP, et al. Phylogenetic and syntenic data support a single horizontal transference to a *Trypanosoma* ancestor of a prokaryotic proline racemase implicated in parasite evasion from host defences. *Parasit Vectors.* 2015;8: 222.
 125. Maslov DA, Opperdoes FR, Kostygov AY, Hashimi H, Lukeš J, Yurchenko V. Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology.* 2019;146: 1–27.
 126. Semini G, Paape D, Blume M, Sernee MF, Peres-Alonso D, Calvignac-Spencer S, et al. Leishmania Encodes a Bacterium-like 2,4-Dienoyl-Coenzyme A Reductase That Is Required for Fatty Acid β -Oxidation and Intracellular Parasite Survival. *MBio.* 2020;11. doi:10.1128/mBio.01057-20
 127. Tavares TS, Mügge FLB, Grazielle-Silva V, Valente BM, Goes WM, Oliveira AER, et al. A *Trypanosoma cruzi* zinc finger protein that is implicated in the control of epimastigote-specific gene expression and metacyclogenesis. *Parasitology.* 2021;148: 1171–1185.
 128. Mosquillo MF, Smircich P, Ciganda M, Lima A, Gambino D, Garat B, et al. Comparative high-throughput analysis of the *Trypanosoma cruzi* response to organometallic compounds. *Metallomics.* 2020;12: 813–828.
 129. Taylor MC, Kelly JM. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol.* 2006;6: 32.
 130. Cronemberger-Andrade A, Xander P, Soares RP, Pessoa NL, Campos MA, Ellis CC, et al. *Trypanosoma cruzi*-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10: 99.
 131. Márvez ER, Segura CAR, Requena JM, Puerta CJ. A dataset of proteins associated with *Trypanosoma cruzi* LYT1 mRNAs. *Data Brief.* 2022;41: 107953.
 132. Romer G, Bracco LA, Ricci AD, Balouz V, Berná L, Villar JC, et al. Deep serological profiling of the *Trypanosoma cruzi* TSSA antigen reveals different epitopes and modes of recognition by Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023;17: e0011542.
 133. Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gíslason MH, Pihl SI, Tsirigos KD, et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat Biotechnol.* 2022;40: 1023–1025.
 134. Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics.* 2008;9: 392.
 135. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 1999;294: 1351–1362.
 136. Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput.* 2002; 310–322.
 137. Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT-BG, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 2013;32: 1478–1488.

138. Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y, Yao X. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel.* 2008;21: 639–644.
139. Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, Basutkar P, Lee J, Edbali O, et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022;50: W276–W279.
140. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009;25: 1189–1191.
141. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021;38: 3022–3027.
142. Hackl T, Ankenbrand MJ. gggenomes: a grammar of graphics for comparative genomics. R package version 09.
143. Meng EC, Goddard TD, Pettersen EF, Couch GS, Pearson ZJ, Morris JH, et al. UCSF ChimeraX: Tools for Structure Building and Analysis. *Protein Sci.* 2023; e4792.
144. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990;96: 23–28.
145. Green MR, Sambrook J. Molecular cloning. A Laboratory Manual 4th. 2012. Available: <http://genesdev.cshlp.org/content/26/13/local/advertising.pdf>
146. Campo V, Di Noia JM, Buscaglia CA, Agüero F, Sánchez DO, Frasch ACC. Differential accumulation of mutations localized in particular domains of the mucin genes expressed in the vertebrate host stage of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;133: 81–91.
147. Green MR, Sambrook J. The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli*: “Ultracompetent” Cells. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020;2020: 101196.
148. Horton RM. PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Mol Biotechnol.* 1995;3: 93–99.
149. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: e45.
150. Tuomi JM, Voorbraak F, Jones DL, Ruijter JM. Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods.* 2010;50: 313–322.
151. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29: e45.
152. Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics.* 2004;20: 2471–2472.
153. Rasband WS. ImageJ, US national institutes of health. [http://rsb.info.nih.gov/ij/\(1997-2007\)](http://rsb.info.nih.gov/ij/(1997-2007)). 2007. Available: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573950399758557312>
154. Abal M, Balouz V, Lopez R, Giorgi ME, Marino C, Cruz CV, et al. An α -Gal antigenic surrogate as a biomarker of treatment evaluation in *Trypanosoma cruzi*-infected children. A retrospective cohort study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2024;18: e0011910.
155. Balouz V, Mesias AC, Camean CC, Ducrey I, Lobo MM, Durante IM, et al. Homologous Expression of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Glycoproteins in *Trypanosoma cruzi*. *Methods Mol Biol.* 2019;1955: 119–134.
156. Bouvier LA, Cámara M de LM, Canepa GE, Miranda MR, Pereira CA. Plasmid vectors and molecular building blocks for the development of genetic manipulation tools for *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.* 2013;8: e80217.

La presente corresponde a la última versión del manuscrito e incluye las correcciones acordadas con los jurados.



Lobo M. Maite

Autora

Carlos Buscaglia

Buscaglia Carlos A.

Director