



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica

# **Transporte y funciones de la prolina en *Trypanosoma cruzi*: su potencial como blanco terapéutico**

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

Lic. Melisa Soledad Martínez Sayé

**Lugar de Trabajo:** Laboratorio de Parasitología Molecular -  
Instituto de Investigaciones Médicas “Alfredo Lanari” (IDIM,  
CONICET-UBA)

**Director de Tesis:** Dr. Claudio A. Pereira

**Consejero de Estudios:** Dra. Cristina Nowicki

Ciudad de Buenos Aires, 2017

## RESUMEN

### Transporte y funciones de la prolina en *Trypanosoma cruzi*: su potencial como blanco terapéutico

La prolina tiene especial relevancia para el parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Este aminoácido puede ser utilizado como fuente de carbono y energía alternativa a la glucosa, participa en mecanismos de resistencia a distintos estreses, y es necesario durante la invasión celular de tripomastigotes metacíclicos y para progresar en el ciclo de vida dentro de las células de mamífero.

En este trabajo se identificó el gen TcAAAP069 de *T. cruzi* como una permeasa de prolina, primero por complementación en levaduras y luego por sobre-expresión en epimastigotes (parásitos Tc069). Si bien la permeasa demostró ser mono-específica el estereoisómero D-prolina fue capaz de inhibir significativamente la incorporación de L-prolina, sugiriendo la presencia de procesos de transporte de D-aminoácidos en el parásito.

Mediante un análisis bioinformático se identificó el gen TcAAAP733 como otra posible permeasa de prolina. Su expresión heteróloga en levaduras deficientes para el transportador de prolina demostró que si bien no es una permeasa de este aminoácido, codifica una permeasa funcional ya que se observaron diferencias significativas respecto al control cuando se evaluó el transporte de una mezcla de aminoácidos.

La sobre-expresión del transportador causó un aumento, no sólo en la concentración intracelular de prolina, sino también en los niveles de ATP. Al enfrentar estos parásitos ante situaciones de estrés oxidativo, nitrosativo o con las drogas tripanocidas actualmente disponibles, nifurtimox y benznidazol, se evidenció que la prolina participa en los mecanismos de respuesta a estas condiciones ya que los parásitos Tc069 fueron significativamente más resistentes en todos los casos.

El estudio del transporte de prolina durante el progreso del cultivo, como situación que emula las distintas condiciones nutricionales de los parásitos en su ciclo de vida, demostró que la permeasa TcAAAP069 está regulada tanto en su actividad y expresión como en su localización subcelular, y esto produce además variaciones en la concentración intracelular de prolina. La máxima actividad y expresión del transportador TcAAAP069 se observó al inicio de la fase exponencial, coincidiendo con

la localización de la permeasa a lo largo de la membrana plasmática además de su presencia en el bolsillo flagelar, siendo esta última localización una característica común a todos los miembros de la familia TcAAP caracterizados hasta el momento. A medida que el cultivo progresó, la expresión y la actividad del transportador disminuyeron gradualmente hasta alcanzar niveles indetectables en la fase estacionaria. Estas disminuciones fueron acompañadas por la pérdida de la localización subcelular en la membrana y finalmente por la desaparición de la proteína, incluso en el bolsillo flagelar. Se observó además que el transporte de prolina no es regulado por la disponibilidad de sustrato. Por último, los estudios realizados modificando el medio o alterando artificialmente la densidad celular del cultivo sugieren que los cambios observados para la permeasa de prolina TcAAP069 estarían relacionados directamente con un factor densidad-dependiente de naturaleza aún desconocida.

Teniendo en cuenta la importancia biológica de la prolina en el parásito *T. cruzi* y nuestros avances en el conocimiento de su transporte, se utilizaron análogos sintéticos del aminoácido a fin de estudiar su efecto sobre la actividad de la permeasa TcAAP069. De los cuatro análogos evaluados, sólo los compuestos denominados ITP-1B e ITP-1G inhibieron el transporte de prolina y también de otros aminoácidos y/o poliaminas pero no de otros metabolitos. Sin embargo, únicamente con el análogo ITP-1G la capacidad de inhibir el transporte estuvo vinculada con una acción tripanocida. El estudio con los análogos de prolina permitió confirmar que la familia de transportadores de aminoácidos y derivados TcAAP es un blanco terapéutico múltiple y prometedor para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la enfermedad de Chagas.

## SUMMARY

### Transport and functions of proline in *Trypanosoma cruzi*: its potential as therapeutic target

The amino acid proline has special relevance for the parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. This amino acid can be used as an energy and carbon source alternative to glucose, it participates in different stress resistance mechanisms, and it is also essential during the cell invasion of metacyclic trypomastigotes and for the life cycle progression inside the mammalian cells.

In this work the TcAAAP069 gene of *T. cruzi* was identified as a proline permease, first through yeast complementation and then by overexpression in epimastigotes (Tc069 parasites). Although the transporter TcAAAP069 proved to be mono-specific, the stereoisomer D-proline was able to significantly inhibit L-proline uptake, suggesting the existence of D-amino acid transport processes in the parasite.

Using an *in silico* approach, the TcAAAP733 gene was identified as another putative proline permease. Its heterologous expression in defective yeasts for the proline transporter showed that despite it is not a permease of this amino acid, it encodes a functional permease since significant differences when compared to controls were observed when the uptake of an amino acid mixture was assessed.

The TcAAAP069 permease overexpression caused an augment not only on proline intracellular concentration but also on ATP levels. When the parasites were challenged against oxidative and nitrosative stress situations, or when were treated with the trypanocidal drugs currently used, nifurtimox and benznidazole, it was evidenced that proline itself participates on the response mechanisms to these conditions since Tc069 parasites were significantly more resistant than control parasites in all the assays.

The study of proline transport throughout the culture progress, as an emulating situation of the different nutritional conditions along the parasites life cycle, proved that the permease TcAAAP069 is regulated both in its activity and expression as in its subcellular localization and this produces variations on proline intracellular concentration too. The maximal activity and expression of TcAAAP069 transporter was

observed at the beginning of the exponential growth phase, together with the localization along the plasmatic membrane besides its presence in the flagellar pocket, being the latter location a common feature to all the members of the TcAAAP family so far characterized. As the culture proceeded, expression and activity of the transporter gradually diminished until undetectable levels were reached on the stationary phase. These decreases were accompanied by the loss of the plasma membrane subcellular localization and finally by the disappearance of the protein, even in the flagellar pocket. In addition, the proline transport was not regulated by substrate availability. Finally, the assays involving medium modification or artificially altered cellular density suggest that the observed changes for the proline permease would be directly influenced by an unknown density-dependent factor.

Taking together the biological relevance of proline for the parasite *T. cruzi* and our advances on the knowledge of its transport, synthetic analogues of this amino acid were evaluated in order to study their effect on the permease TcAAAP069 activity. Of the four analogues tested, only the compounds named ITP-1B and ITP-1G significantly inhibited the proline transport and also of other amino acid and/or polyamines, but not the uptake of other metabolites. However, exclusively with the analogue ITP-1G the ability to inhibit the transport was linked with a trypanocidal action. The study with the proline analogues confirmed the amino acid and derivatives transporter family TcAAAP as a multiple and promising therapeutic target for the development of new treatments against Chagas disease.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento para llevar a cabo este trabajo, y a CONICET además por la beca que me permitió realizar esta tesis doctoral.

Gracias a todo el equipo del laboratorio de Parasitología Molecular por el conocimiento, el compañerismo, el aguante, las risas, los festejos.

Gracias Claudio por darme la oportunidad allá en el año 2010 de formar parte de este gran equipo de trabajo y acompañarme durante todo el camino.

Gracias familia por ser familia, por distraerme en los momentos necesarios y por el apoyo incondicional.

Gracias amigos y amigas por la paciencia, la buena onda, la compañía, los mates, los chismes.

Gracias Map por compartir mis éxitos y mis fracasos, por hacerme ver el vaso medio lleno y por estar siempre a mi lado.

Gracias mamá y papá, sin Uds. no hubiera llegado ni a la esquina.

We are all stories at the end..  
just make it a good one

- Doctor Who

# Contenidos

Abreviaturas.....	11
Introducción.....	13
Enfermedad de Chagas .....	14
Generalidades. ....	14
Transmisión .....	15
El vector.....	16
Etapas de la enfermedad .....	18
Diagnóstico.....	18
Tratamiento de la enfermedad .....	19
Prevención y control de la enfermedad.....	20
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	22
Morfología del parásito.....	22
Ciclo de vida .....	27
Genómica de tripanosomátidos.....	29
Transcripción génica en <i>T. cruzi</i> .....	31
Herramientas para la manipulación genética de <i>T. cruzi</i> .....	33
Vectores de expresión para <i>T. cruzi</i> .....	33
Metabolismo de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
Metabolismo de glucosa .....	35
Metabolismo de aminoácidos.....	37
Metabolismo de prolina .....	39
Sistemas de transporte de metabolitos .....	41
Generalidades .....	41
Transportadores en <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	42
Transporte de glucosa.....	43
Transporte de poliaminas .....	43
Transporte de aminoácidos.....	44
Transporte de prolina.....	46
Hipótesis y Objetivos.....	47
Materiales y Métodos .....	49
Soluciones y medios utilizados.....	50
Manipulación de microorganismos.....	51
Técnicas de biología molecular .....	52



Manipulación y obtención de ADN .....	54
Técnicas para análisis de proteínas.....	57
Fijación de parásitos e Inmunofluorescencias Indirectas .....	58
Citometrías de flujo.....	58
Ensayos de transporte.....	59
Determinación de Prolina Intracelular .....	61
Determinacion de ATP intracelular .....	61
Tratamientos .....	62
Obtención de medio de cultivo condicionado .....	63
Análogos de prolina.....	63
Técnicas bioinformáticas.....	63
Análisis estadísticos.....	64
Plásmidos utilizados .....	64
pGEM-T easy .....	64
pDR196.....	64
p416.....	64
pTEX.....	65
pTRES.....	65
pTRESL.....	66
Construcciones genéticas.....	66
pDR196-TcAAAP069 y pDR196 de otros miembros de la familia TcAAAP .....	66
pGEM-Teasy-TcAAAP069 .....	67
pGEM-Teasy-(Spe)TcAAAP069 .....	67
pGEM-Teasy-TcAAAP733 .....	68
p416-TcAAAP069.....	68
p416-TcAAAP733.....	68
pTRES-TcAAAP069.....	68
pTRES-GFP::TcAAAP069 .....	68
pTRES-mCherry::TcAAAP069.....	68
pTRES-mCherry::TcAAAP411.....	69
pTEX-mCherry::AQP .....	69
pTEX-TcBilbo::GFP .....	69
Resultados .....	70
Capítulo 1. Identificación del transportador de prolina y su caracterización bioquímica .....	71

1.1 Complementación en levaduras.....	71
1.2 Generación del modelo de parásitos transgénicos.....	73
1.3 Especificidad del transportador de prolina Tc069 .....	75
1.4 Localización subcelular.....	78
1.5 Evaluación de otros posibles transportadores de prolina .....	80
Capítulo 2. Prolina y estrés.....	83
2.1 Prolina intracelular y ATP .....	83
2.2 Resistencia a estrés oxidativo .....	85
2.3 Resistencia a estrés nitrosativo.....	87
2.4 Resistencia a drogas tripanocidas .....	87
Capítulo 3. Regulación del transporte de prolina .....	89
3.1 Actividad, expresión y localización del transportador de prolina a lo largo del crecimiento .....	89
3.2 Evaluación del transporte en distintas condiciones.....	94
Capítulo 4. Análogos de prolina .....	98
4.1 Estructura de los análogos de prolina .....	98
4.2 Inhibición del transporte de prolina.....	99
4.3 Inhibición dosis-dependiente .....	100
4.4 Concentración intracelular de prolina .....	100
4.5 Efecto tripanocida .....	101
4.6 Inhibición de otros transportes.....	103
Discusión .....	106
Propiedades del transportador de prolina TcAAAP069 .....	108
Prolina y estrés .....	110
Regulación del transportador de prolina TcAAAP069.....	112
Análogos de prolina.....	114
Conclusiones .....	118
Bibliografía.....	120
Difusión de Resultados.....	135

# Abreviaturas

aa aminoácido

AAAP *amino acid/auxin permease* (permeasa de aminoácidos/auxinas)

ADN ácido desoxirribonucleico

ADP adenosín difosfato

AK arginina quinasa

ARN ácido ribonucleico

ARNm ARN mensajero

ARNr ARN ribosomal

ARNsn ARN pequeño nuclear (*small nuclear*)

ARNt ARN de transferencia

ATP adenosín trifosfato

BHI infusión de cerebro-corazón

BLAST *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA seroalbúmina bovina

CDC *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros de Prevención y Control de Enfermedades)

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol

DIC *differential interference contrast* (contraste diferencial de interferencia)

DMSO dimetil-sulfóxido

DTU *discrete typing unit* (unidad discreta de tipificación)

ELISA *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)

GAPDH gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (también llamada GPD)

GDH glutamato deshidrogenasa

GFP *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

IFI inmunofluorescencia indirecta

IPTG isopropil-beta-D-tiogalactopiranósido

IR *intergenic region* (región intergénica)

LB medio Luria-Bertani

ORF *open reading frame* (marco abierto de lectura)

P5CDH  $\Delta^1$ -pirrolin-5-carboxilato-deshidrogenasa

PAHO *Pan American Health Organization* (Organización Panamericana de la Salud)

PCR *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PEG polietilenglicol

PGC *polycistronic gene cluster*

PRAC prolina racemasa

ProDH prolina deshidrogenasa

PTU *polycistronic transcription unit* (unidad de transcripción policistrónica)

PVDF *polyvinylidene difluoride* (membrana de di-fluoruro de polivinilideno)

ROS *reactive oxygen species* (especies reactivas del oxígeno)

SL *spliced leader* (mini-exón)

SDS dodecil sulfato sódico

SFB suero fetal bovino

TDR *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* (Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales)

UTR *untranslated region* (región no traducible)

WB Western-Blot

WHO *World Health Organization* (Organización Mundial de la Salud)

WT *wild type* (genotipo silvestre)

X-Gal 5- bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactpiranósido

# **Introducción**

---

# Enfermedad de Chagas

## ***Generalidades.***

La enfermedad de Chagas, denominada así en reconocimiento a su descubridor Carlos Chagas, es una enfermedad parasitaria ampliamente distribuida en América causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. También llamada tripanosomiasis americana, es considerada una enfermedad endémica que prevalece mayoritariamente en las regiones rurales más pobres, en donde las condiciones de vida precarias facilitan la transmisión del parásito (Barrett et al. 2003). Este parásito normalmente se transmite al ser humano y a otros mamíferos a través de insectos hemípteros que se alimentan de sangre (hematófagos), conocidos en la mayor parte de Argentina como “vinchucas” o “chinches” (Canale et al. 2009).

La enfermedad de Chagas se encuentra principalmente en América Latina, pero en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental (Figura 1) (World Health Organization 2015).



**Figura 1.** Población global estimada infectada con *Trypanosoma cruzi* (Perez et al. 2015).

En nuestro país se estima la existencia de cerca dos millones de personas infectadas, 600.000 de ellas con manifestaciones clínicas de la enfermedad. Se estima que aproximadamente 300.000 niños menores de 15 años (el 3,4%) tienen la enfermedad de Chagas. Cabe destacar que el 98% de los nuevos casos de Chagas ocurre antes de los 14 años (Crocco et al. 2002).

### ***Transmisión***

El parásito *T. cruzi* puede ser transmitido al hombre por diferentes vías:

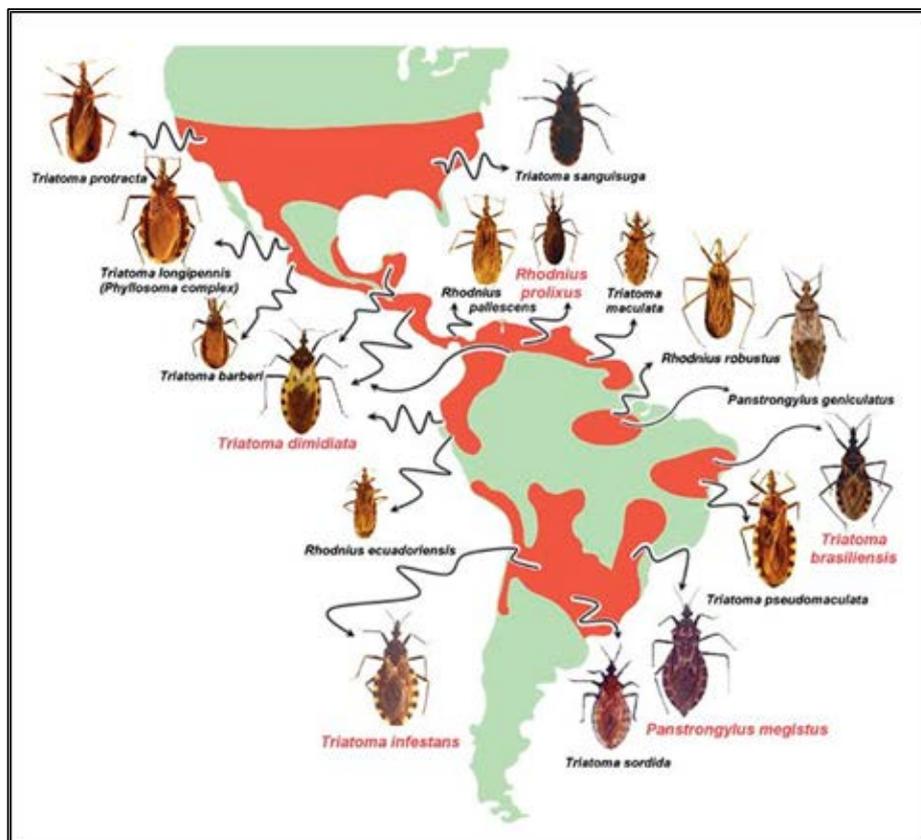
- Transmisión vectorial: la transmisión a través del insecto vector representa más del 80% de todos los casos de enfermedad de Chagas (Barrett et al. 2003). Las vinchucas ingieren parásitos cuando se alimentan de la sangre de un organismo infectado. Cuando esta vinchuca infectada pica a una persona sana, al alimentarse de sangre, defeca, y junto a las heces elimina los parásitos. Si la persona se rasca, se producen micro excoriaciones (falta de una porción de piel que llega hasta la dermis) por las que ingresan los tripanosomas generando la infección. Es decir que la transmisión no es por la picadura sino por las heces que se eliminan durante o inmediatamente después de que el insecto se alimenta.
- Por transfusiones de sangre: la transmisión del *T. cruzi* por transfusión sanguínea ha pasado a constituir, después de la vectorial, la segunda causa de infección en diversas regiones de América; no obstante es el más fácil de prevenir a través del control de bancos de sangre y de los donantes. Este tipo de transmisión presenta una compleja sintomatología y su manejo suele ser difícil, más que nada porque se ignora este riesgo. Entre un 10 y un 20% de los que se infectan no presentan síntomas. Entre los sintomáticos, la gravedad del cuadro depende principalmente de su respuesta inmune (Barrett et al. 2003).
- Por trasplantes de órganos desde donantes infectados: Se ha reportado, sobre todo, en casos de trasplante de riñón (Coura et al. 2002).
- Transmisión congénita, a través de la placenta de la madre infectada. A veces el parásito atraviesa la placenta desde la madre infectada al feto, sin embargo la mayoría de los recién nacidos infectados de esta manera no presentan síntomas evidentes. No obstante, si se identifica en ellos la enfermedad, los tratamientos

actuales son altamente efectivos con elevados porcentajes de curación. Por esta razón es importante el estudio diagnóstico de la enfermedad durante el embarazo mediante pruebas de laboratorio y la detección de las personas infectadas para diagnosticar la infección en sus hijos en el momento del nacimiento y proceder al tratamiento temprano con elevados índices de curación (Crocco et al. 2002).

- Otras vías de transmisión menos frecuentes son a través de la ingesta de sustancias contaminadas con excrementos del vector y por accidentes de laboratorio (Canale et al. 2009).

### ***El vector***

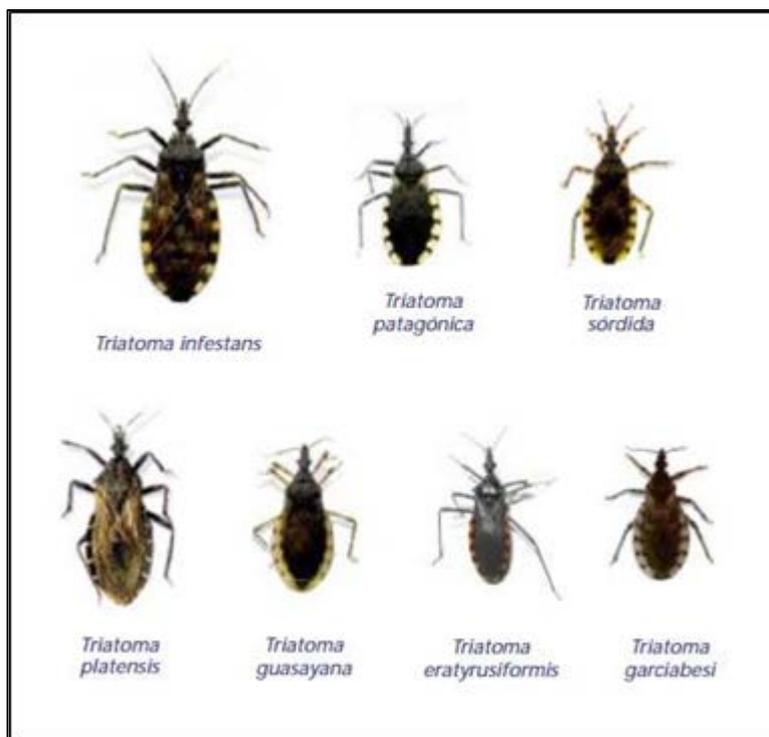
En el mundo existen alrededor de 130 especies de triatomos y más de la mitad han sido natural y/o experimentalmente infectados con *Trypanosoma cruzi*, pero son menos de 10 las especies que tienen importancia epidemiológica por su capacidad de colonizar la vivienda humana (Figura 2).



**Figura 2.** Distribución de especies de insectos triatomos en América. Las especies resaltadas en rojo son consideradas los vectores más importantes del parásito *T. cruzi*.



En la Argentina, actualmente, se considera que existen 16 especies de triatominos, distribuidos en tres géneros principales: *Psamolestes*, *Panstrongylus* y *Triatoma*. Estas especies difieren en importancia epidemiológica según su hábitat, densidad poblacional y distribución geográfica. En nuestro país *Triatoma infestans* es el único triatomino domiciliado, por lo tanto el único de importancia epidemiológica. Otros, como *T. guasayana*, *T. sordida*, *T. eratyrusiformis* y *T. patagonica*, si bien son especies silvestres y peridomiciliadas, pueden hallarse infectadas por *Trypanosoma cruzi* y frecuentemente invadir y en algunos casos colonizar la vivienda con infecciones a humanos y a perros. De este modo se comportarían como vectores secundarios en las áreas domésticas y peridomésticas. Las restantes especies son silvestres y/o peridomiciliadas, siendo excepcionalmente atraídas por la luz, llegando ejemplares adultos a las viviendas pero sin colonizar en ellas, por lo que carecen de importancia en el ámbito de la salud pública; son los triatominos que contribuyen al mantenimiento del ciclo silvestre del *Trypanosoma cruzi* (Figura 3) (Canale et al. 2009).



**Figura 3.** Principales especies de insectos triatominos presentes en Argentina (Canale et al. 2009).

No todas las vinchucas son portadoras del protozoo *T. cruzi*, sólo aquellas que se han alimentado de la sangre de algún mamífero infectado (ya sea perro, roedor o humano).

Las aves no permiten el desarrollo del parásito ni de la enfermedad debido a diferencias en su sistema inmunológico (Crocco et al. 2002).

### ***Etapas de la enfermedad***

Desde el punto de vista clínico la enfermedad de Chagas evoluciona en dos fases: aguda y crónica; y a su vez, esta última puede presentarse en forma indeterminada o visceral. Ambas fases tienen características clínicas y criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes. La fase aguda se caracteriza por la presencia del parásito en sangre y tiene un período de incubación de aproximadamente 10 días, generalmente asintomático. Sólo alrededor del 5% de los pacientes presentan síntomas específicos, como el complejo oftalmoganglionar (síndrome de Romaña) y el chagoma de inoculación. Entre las manifestaciones clínicas generales se incluye fiebre prolongada, -que en zonas endémicas debe ser considerada como síntoma guía-, dolor de cabeza y malestar general, mientras que algunos pacientes, principalmente niños e inmunodeficientes, presentan cuadros meníngeos graves e insuficiencia cardíaca que pueden llevar a la muerte. Esta fase puede durar aproximadamente 16 semanas (Barrett et al. 2003). Finalizada la etapa aguda se inicia la fase crónica en su forma indeterminada, en la que la parasitemia se hace indetectable por los métodos parasitológicos y se caracteriza por la ausencia de manifestaciones clínicas, electrocardiográficas o radiológicas significativas (Canale et al. 2009). En Argentina, la fase crónica visceral se presenta en alrededor del 30% de los pacientes a los 10 o 20 años después de que ha ingresado el parásito al organismo. La afección clínica más importante es la cardiopatía chagásica. Sus síntomas más comunes son: palpitaciones, disnea, agitación y dolores en la zona cardíaca. La gravedad del proceso es variable, y puede incluir insuficiencia cardíaca y en muchos casos paro cardíaco. El porcentaje de mortalidad por esta enfermedad varía del 1% al 5% (Crocco et al. 2002).

### ***Diagnóstico***

La enfermedad puede ser diagnosticada durante la fase aguda por la presencia de síntomas clínicos conocidos como Chagoma y signo de Romaña. Dentro de los dos primeros meses, la enfermedad también puede ser diagnosticada mediante análisis directo de sangre en donde puede observarse la presencia de tripomastigotes. Dentro

de este período también pueden emplearse el cultivo de sangre y análisis serológico para la determinación de la presencia de parásitos. Los ensayos de aglutinación sobre sueros de pacientes son suficientemente sensibles como para permitir el diagnóstico de la fase aguda cuando el número de organismos infecciosos es escaso. Sin embargo, normalmente, los anticuerpos no se desarrollan hasta varios meses luego de la infección inicial imposibilitando la práctica de otras técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la técnica de ELISA.

Otro método simple y práctico empleado es el xenodiagnóstico. Consiste en alimentar al triatomino con sangre del paciente y luego de dos a tres semanas es disectado y examinado para detectar la presencia de parásitos en el intestino.

Finalmente, herramientas más modernas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también están siendo utilizadas para el diagnóstico de rutina de la enfermedad. Recientemente se han normalizado los protocolos de diagnóstico por PCR a nivel mundial y se está implementando la estrategia de *real time* PCR (PCR en tiempo real) para el monitoreo y cuantificación de parásitos en pacientes enfermos (Duffy et al. 2009).

### ***Tratamiento de la enfermedad***

Las drogas actualmente aceptadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el nifurtimox y el benznidazol, comercializadas inicialmente en 1967 por Bayer Health Care y en 1972 por Roche, respectivamente. En marzo de 2012, el benznidazol se comenzó a producir en nuestro país por una iniciativa público-privada que reúne al Ministerio de Salud de la Nación, Mundo Sano y las compañías Maprimed (a cargo de la síntesis del principio activo) y el laboratorio farmacéutico ELEA (responsable de la formulación, inscripción y distribución).

Hasta la fecha, no se conoce el mecanismo de acción exacto, no obstante, se propuso que actuarían a través de una vía reductiva que conduciría a la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales provocarían la peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas y degradación del ADN del parásito (Hall et al. 2011; Hall & Wilkinson 2012; Rajão et al. 2014). Tanto el nifurtimox como el benznidazol demostraron rápidamente ser efectivos para el tratamiento de la fase aguda, pero no en la fase crónica debido a la

alta frecuencia de efectos secundarios indeseados, bajos índices de cura, y a la falta de consenso internacional en cuanto a criterios de diagnóstico y de cura parasitológica (Jannin & Villa 2007). Lamentablemente, en el año 2015 fueron publicados los resultados del estudio BENEFIT (del inglés, *Benznidazol Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) y se ha demostrado que el benznidazol no reduce el deterioro cardíaco en pacientes con cardiomiopatía chagásica (Morillo et al. 2015); sin embargo aún se aconseja el tratamiento de pacientes en fase crónica.

La enfermedad de Chagas debe ser tratada como una enfermedad parasitaria, siendo el objetivo principal reducir la carga de parásitos para mejorar la efectividad del sistema inmune y para disminuir el progreso de la enfermedad hacia la cardiomiopatía (Sosa-Estani et al. 2009).

### ***Prevención y control de la enfermedad***

Dado que no hay vacuna contra la enfermedad de Chagas, el método más eficaz para prevenirla en América Latina es el control vectorial. El análisis de la sangre donada es también necesario para prevenir la infección por transfusiones sanguíneas y donación de órganos (Tabla I).

**Tabla I.** Parámetros epidemiológicos correspondientes al período 1990-2006. Fuente: WHO/PAHO/TDR

<b>Parámetros epidemiológicos</b>	<b>1990</b>	<b>2000</b>	<b>2006</b>
Muertes anuales	>45.000	21.000	12.500
Casos humanos de infección	30 millones	18 millones	15 millones
Nuevos casos anuales	700.000	200.000	41.200
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones
Distribución	21 países	19 países	18 países

El abordaje subregional adoptado en los países de las Américas para enfrentar el problema de la enfermedad de Chagas, tiene su fundamento en criterios entomológicos y epidemiológicos, pero en general los objetivos son los de eliminar la transmisión vectorial y transfusional del parásito, estableciéndose estrategias de intervención diferenciadas según aquellos criterios mencionados (Figura 4).



**Figura 4.** Iniciativas establecidas en América para controlar la enfermedad de Chagas (Guhl 2009).

En 1991 nació la Iniciativa de los países del Cono Sur, con el objetivo central de interrumpir la transmisión vectorial y transfusional de la enfermedad de Chagas en Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay y sur de Perú. Tres países del Cono Sur, Uruguay, Chile y Brasil han obtenido una certificación de interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas por *Triatoma infestans* por parte de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), avalada por todos los Ministerios de Salud de la subregión, lo cual constituye un logro muy importante en términos de la reducción de la incidencia. Por otra parte, Argentina ha logrado la interrupción vectorial de la transmisión en cinco de las 19 provincias endémicas y los demás países del Cono Sur cuentan con programas de control vectorial activos.

Actualmente existe un número importante de diferentes métodos y estrategias para el control vectorial: insecticidas piretroides de efecto residual, nuevos materiales de construcción para la modificación de las viviendas rurales, métodos entomológicos para detectar bajas densidades en la población de los triatominos, cajas sensoras para la

detección de reinfestaciones domiciliarias y otros, como los potes fumígenos y las pinturas insecticidas de lenta liberación (World Health Organization & Mundo Sano 2007).

Las acciones de control y vigilancia deben ser paralelas, teniendo en cuenta la necesidad de vigilar de manera permanente el riesgo siempre presente de las poblaciones de triatominos silvestres que constituyen un importante factor en el proceso de reinfestación de las viviendas (Guhl F & Lazdins-Helds 2007).

## ***Trypanosoma cruzi***

El parásito *Trypanosoma cruzi* pertenece al subreino de los protozoos, del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, un grupo que también incluye a *Trypanosoma brucei* y al género *Leishmania*, responsables de la enfermedad del sueño y la leishmaniasis respectivamente. Todos los miembros de este orden se caracterizan por la presencia de una organela peculiar que los define: el kinetoplasto (ver más adelante en esta misma sección).

Como el parásito *T. cruzi* presenta elevada variabilidad genética, se ha adoptado una nomenclatura para clasificar las distintas cepas del parásito en 6 unidades discretas de tipificación (DTU por sus siglas en inglés, *Discrete Typing Unit*): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI. Cada DTU presenta diferentes características eco-epidemiológicas, clínicas y geográficas (Zingales et al. 2012).

### ***Morfología del parásito***

Los protozoos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae difieren de muchas otras células eucariotas por contener estructuras citoplasmáticas y organelas especiales. Una característica en común es la presencia del mitocondrión y el glicosoma además del mencionado kinetoplasto (Figura 5) (Tibayrenc & Tellería 2010). Asimismo la presencia de varias estructuras inusuales del citoesqueleto y su particular genética hacen que estos organismos no sólo sean estudiados por su carácter patogénico sino también por su interesante biología.

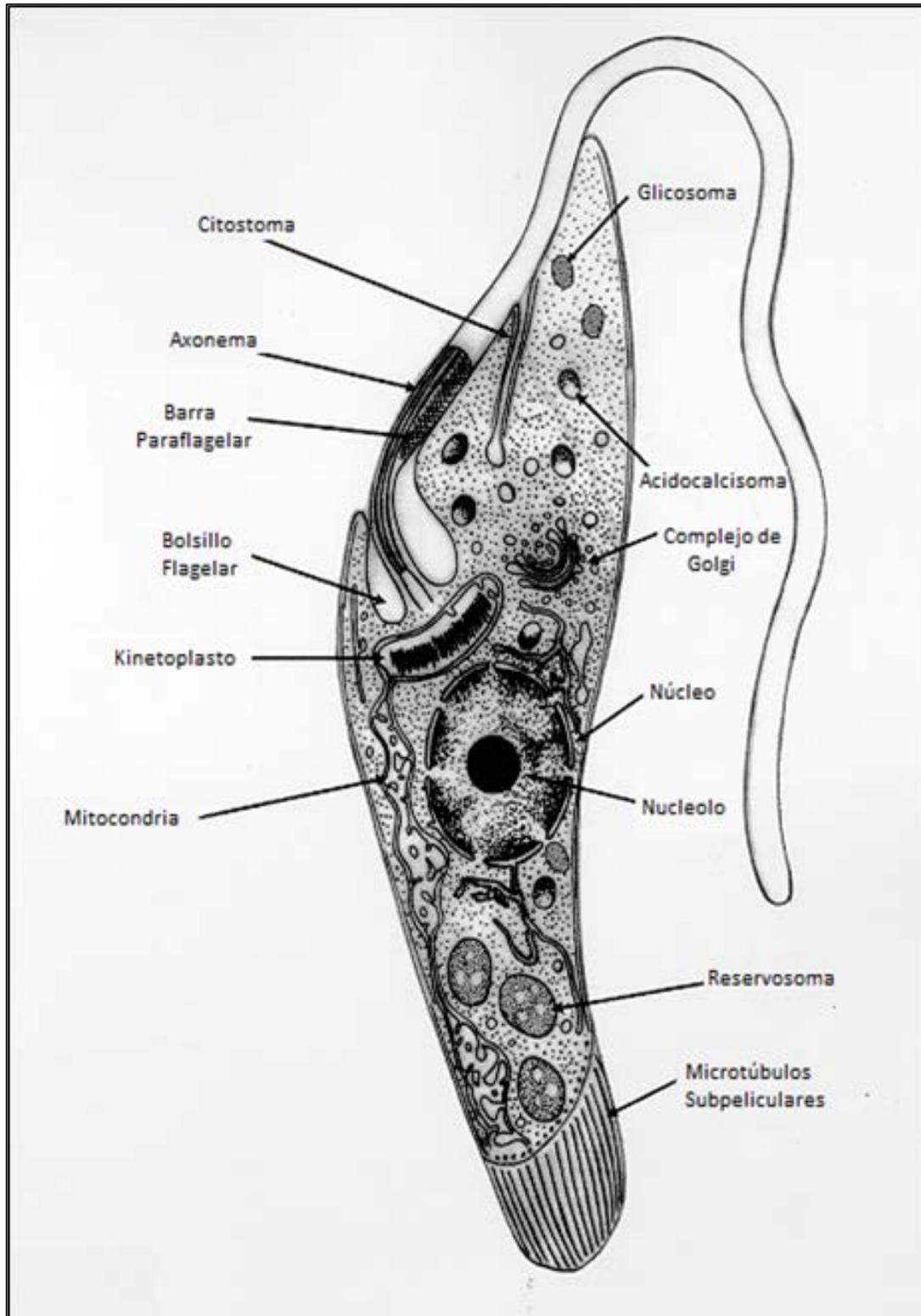


Figura 5. Morfología de un epimastigote de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de De Souza 1999.

### Núcleo

En tripomastigotes el núcleo es elongado y se localiza en la porción central del protozoo. En amastigotes y epimastigotes presenta forma redondeada. Se encuentra rodeado de una membrana nuclear típica provista de poros. Puede observarse continuidad entre la

membrana nuclear externa y el retículo endoplásmico. En el centro del núcleo, o ligeramente desfasado, puede encontrarse el nucléolo (De Souza 2002).

### **Superficie celular**

La superficie celular de los tripanosomátidos puede considerarse compuesta por dos componentes: la membrana plasmática y una capa formada por los microtúbulos subpeliculares. Se ha observado que los microtúbulos están conectados entre sí y a la membrana plasmática a través de filamentos cortos (De Souza 2002).

La membrana, si bien es una estructura continua, presenta diferencias morfológicas y de composición que permiten dividirla en tres dominios: la membrana del cuerpo del parásito, la membrana del flagelo y la membrana del bolsillo flagelar. Cada uno de estos dominios representa una membrana altamente especializada con funciones distintivas y composición proteica y lipídica única (Landfear & Ignatushchenko 2001).

### **Bolsillo flagelar**

Todos los tripanosomátidos presentan una región llamada bolsillo flagelar, que consiste en una depresión en la región anterior del parásito, desde donde el flagelo emerge.

El bolsillo flagelar es una invaginación profunda de la membrana plasmática localizado en la base del flagelo. Esta depresión permite el contacto directo entre la membrana del cuerpo celular y la membrana del flagelo y por esta razón el bolsillo flagelar es considerado como un compartimento extracelular especial aislado del medio externo.

Existe evidencia de que el bolsillo flagelar es una región altamente especializada de la superficie de los tripanosomas, a saber: (a) es la única región que no presenta la capa de microtúbulos subpeliculares; (b) la membrana que rodea el bolsillo difiere de la membrana del cuerpo celular y de la membrana del flagelo, tanto en la distribución de las partículas intramembranas como en la localización de proteínas; (c) numerosas evidencias morfológicas y citoquímicas indican una intensa actividad endocítica y exocítica en el bolsillo flagelar (De Souza 2002).

### **Flagelo**

El flagelo de los tripanosomátidos está involucrado en varios procesos biológicos importantes, como motilidad, señalización, división celular, invasión de células del



hospedador mamífero y fijación al intestino en el insecto vector (De Souza 1999; Landfear & Ignatushchenko 2001; Gull 2003; Hill 2003; Langousis & Hill 2014).

El flagelo emerge desde el bolsillo flagelar, y posee una estructura similar a otros flagelos. Al costado del axonema se encuentra una estructura filamentosa llamada barra paraflagelar o paraxial (De Souza 2002).

### **Complejo mitocondria-kinetoplasto**

Los tripanosomátidos poseen una única y altamente ramificada mitocondria que recorre todo el cuerpo celular incluyendo el flagelo.

El kinetoplasto es una estructura densa y posee su propio tipo de ADN, conocido como ADN kinetoplastídico (ADNk). Este ADNk se encuentra localizado en una región especializada de la mitocondria, dentro de la matriz mitocondrial y perpendicular al eje del flagelo (Tibayrenc & Tellería 2010).

El ADNk puede representar hasta un 30% del ADN total del protozoo. Básicamente está formado por una red de 20,000-30,000 minicírculos encadenados; además presenta maxicírculos que corresponden al ADN mitocondrial. Cada minicírculo está formado por 1440pb, y análisis realizados con enzimas de restricción revelaron que son altamente heterogéneos en sus secuencias, haciendo posible distinguir entre diferentes stocks, cepas y clones dentro de una misma especie de tripanosomátidos. Los minicírculos de ADN codifican pequeños ARN guías que controlan la especificidad del proceso de edición del ARNm formado a partir de los maxicírculos (De Souza 1999).

### **Glicosoma**

Pertenece al grupo de los peroxisomas, llamándose glicosoma debido a que concentra y compartimentaliza las seis primeras enzimas involucradas en la vía glucolítica, incrementando la eficiencia de dicho proceso (De Souza, 1999).

Estudios bioquímicos revelaron que en esta organela tienen lugar los siguientes procesos metabólicos: glucólisis, metabolismo de peróxidos,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, síntesis de éteres fosfolípidos, fijación de carbono, vía de salvataje de purinas, biosíntesis *de novo* de pirimidinas, elongación de ácidos grasos, biosíntesis de isoprenoides y biosíntesis de esteroides.

El glicosoma no posee un genoma propio, por lo tanto, las enzimas encargadas de todos los procesos metabólicos enumerados son codificadas por genes nucleares, traducidas

por ribosomas citoplásmicos y luego importadas dentro de la organela (Tellería & Tibayrenc, 2010).

### **Acidocalcísoma**

Es una estructura con contenido electrodenso y rodeada por una membrana.

Los acidocalcísomas se ubican a lo largo de todo el cuerpo celular del parásito, aunque preferentemente se localizan en la periferia celular. El número de acidocalcísomas varía de especie a especie, e incluso entre los distintos estadios del ciclo de vida de los tripanosomátidos.

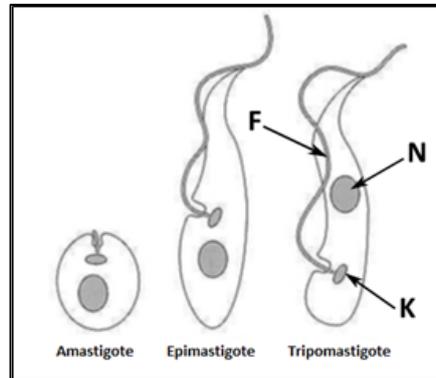
De acuerdo a la información disponible es posible que esta organela esté involucrada en varios procesos biológicos: (a) almacenamiento de  $\text{Ca}^{+2}$ , para ser utilizado en ciertos momentos del ciclo vital del parásito; (b) almacenamiento de energía, dado que contiene elevadas cantidades de fosfato inorgánico; (c) debido a la presencia de una  $\text{H}^{+}$ -ATPasa en la membrana del acidocalcísoma, podría tener algún rol en la regulación del pH citoplasmático; y (d) esta organela podría estar involucrada en el control de la osmorregulación (De Souza et al. 2000).

### **Reservosoma**

Esta organela fue designada reservosoma debido a dos criterios. Primero, porque todas las macromoléculas ingeridas por el parásito mediante procesos endocíticos se acumulan en esta organela. Segundo, porque estas estructuras desaparecen gradualmente cuando se incuban los epimastigotes en un medio pobre, condición que desencadena la transformación del epimastigote no infectivo a tripomastigote infectivo. Las macromoléculas son ingeridas a través del citostoma, una estructura altamente especializada que se encuentra en la superficie del parásito, cerca del bolsillo flagelar y a través del mismo. El proceso endocítico involucra la formación de pequeñas vesículas citoplasmáticas. Estas vesículas se fusionan unas con otras, formando una intrincada y ramificada red de túbulos distribuida desde la región perinuclear a la región posterior que eventualmente se fusionan dando origen al reservosoma (De Souza et al. 2000).

## ***Ciclo de vida***

El ciclo de vida de *T. cruzi* incluye dos hospedadores, uno invertebrado y otro vertebrado, al cual se transmite a través de insectos triatominos. El parásito posee morfologías diferentes a lo largo de las distintas etapas de su ciclo vital (Figura 6) (Vazquez 2007).



**Figura 6.** Diferentes morfologías del parásito *Trypanosoma cruzi* (Gull 1999). F: Flagelo; N: Núcleo; K: Kinetoplasto

A) Amastigotes. Este estadio del parásito se caracteriza por su forma redondeada y la ausencia de flagelo emergente. Se trata de una forma replicativa y de localización intracelular. Numerosos estudios demostraron que pueden ser infectivos para células de vertebrados (De Souza 2002). El epimastigote intracelular es un estadio transiente en el proceso de diferenciación de amastigote a tripomastigote sanguíneo, y comparte características con ambos, aunque sus propiedades predominantes, incluyendo la morfología general, son similares al epimastigote (Meyer & Oliveira 1948; Faucher et al. 1995; Almeida-de-Faria et al. 1999; Tyler & Engman 2001).

B) Epimastigotes. Son células con forma alargada, de 20-40  $\mu\text{m}$  de largo. El kinetoplasto se encuentra ubicado por delante del núcleo. Estas formas se observan en la fase exponencial de crecimiento en parásitos mantenidos en cultivos axénicos y en el intestino del hospedador invertebrado. Tienen capacidad replicativa y no son infectivos (De Souza 2002). Son fácilmente cultivados *in vitro* en medio líquido.

C) Tripomastigotes. Tienen aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de longitud, y un diámetro de 2  $\mu\text{m}$ . El kinetoplasto se ubica por detrás del núcleo. Se encuentra en los tejidos y en la sangre del hospedador vertebrado, en el intestino posterior, heces y orina del invertebrado, en la fase estacionaria de crecimiento en cultivos axénicos y en fase líquida de cultivos celulares. Se denomina tripomastigote sanguíneos a las formas

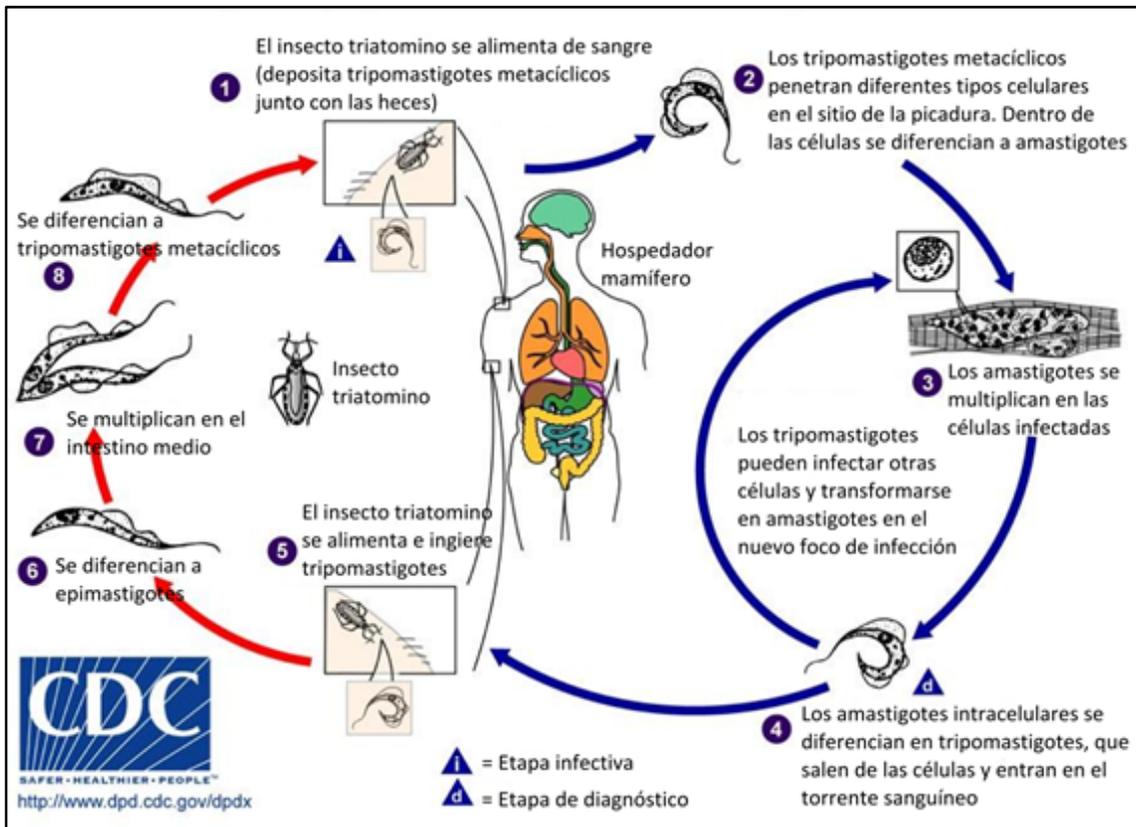
circulantes en el vertebrado y metacíclicos a las formas infectivas en el invertebrado (De Souza 2002).

El parásito es ingerido por el insecto vector a partir de un humano o animal infectado junto con la sangre (tripomastigotes sanguíneos). Una vez ingeridos, la mayoría de los tripomastigotes se lisan luego de interactuar con las bacterias en el estómago del insecto; los que sobreviven se transforman unos días después en la forma epimastigote. Los epimastigotes migran al intestino, donde se dividen intensamente por fisión binaria y se adhieren a las membranas perimicrovellosas de las células del intestino delgado posterior, formando un reservorio de parásitos en este hospedador. La adhesión a las paredes del intestino involucra la participación de glicoconjugados expuestos superficialmente.

En la región posterior del intestino y en el recto, muchos epimastigotes se despegan de las paredes intestinales y se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que son liberados junto con las heces y la orina del insecto cuando éste se alimenta. La infección en los mamíferos suele darse luego de la picadura de un insecto triatomino, cuando el tripomastigote metacíclico penetra directamente al organismo a través de una membrana mucosa o de una lesión en la piel producida por ejemplo al rascarse (Figura 7).

Una vez dentro del hospedador vertebrado los tripomastigotes metacíclicos invaden las células a través de diversos mecanismos, que involucran la fagocitosis y la endocitosis inducida. Luego de la invasión, el parásito se encuentra dentro de una vacuola endocítica conocida como vacuola parasitófora. Unas horas luego de la infección celular, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes. Al mismo tiempo, el parásito secreta enzimas que ayudan a digerir la membrana que recubre la vacuola parasitófora, permitiendo a los amastigotes entrar en contacto directo con las organelas de la célula hospedadora (De Souza et al. 2010).

Luego de múltiples ciclos de fisión binaria, los amastigotes se convierten en tripomastigotes sanguíneos que se liberan cuando la célula hospedadora se lisa y circulan por el torrente sanguíneo. Una vez allí, pueden invadir otras células del hospedador y esparcir la infección a otros tejidos, o bien ser ingeridos nuevamente por el insecto vector cerrando el ciclo de vida (Tyler & Engman 2001).



**Figura 7.** Ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*. El ciclo comienza cuando una persona es picada por un insecto infectado (paso 1) y se rasca la herida, permitiendo el ingreso del parásito defecado por el insecto (paso 2). El parásito se multiplica en los tejidos infectados y se distribuye por el torrente sanguíneo, infectando otros tejidos (pasos 3 y 4). Cuando una vinchuca no infectada se alimenta de esta persona, ingiere el parásito (paso 5), el cual se desarrolla y multiplica en el estómago e intestino (pasos 6, 7 y 8). La vinchuca infectada puede picar a otra persona (paso 1) y reiniciar el ciclo.

Adaptado del CDC.

## Genómica de tripanosomátidos

Los proyectos genoma de tripanosomátidos comenzaron a organizarse y tomar impulso en la década del 90. El proyecto "TriTryp", que comprendía los parásitos *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major* (denominados TriTryps), comenzó en el año 2000 y concluyó en el 2005 (Ivens et al. 2005; Berriman et al. 2005; El-Sayed, Myler, Bartholomeu, et al. 2005a). Si bien los TriTryps comparten muchas características

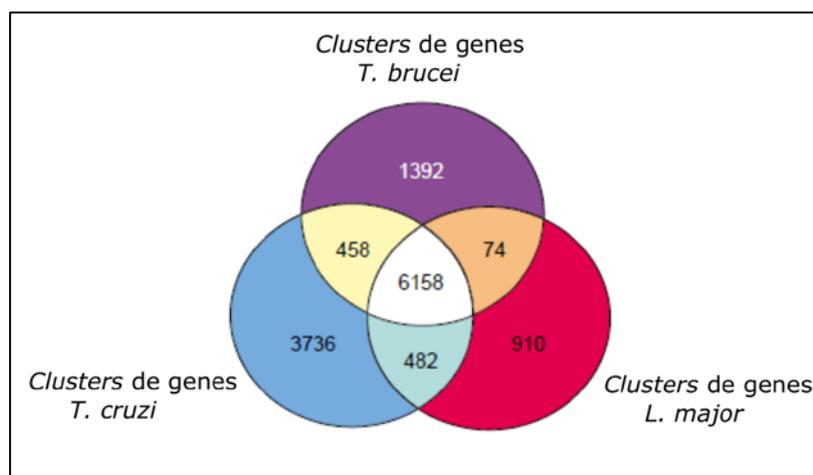
generales, como el kinetoplasto y los glicosomas, cada uno de estos parásitos es transmitido por un insecto vector diferente e incluso sus ciclos de vida son distintos, con diferentes blancos celulares y tisulares, y causando distintas patogénesis en sus hospedadores mamíferos.

*T. cruzi* posee un genoma diploide estimado en aproximadamente 106,4 Mb (El-Sayed, Myler, Bartholomeu, et al. 2005b). Diferentes análisis de densitometría y electroforesis de campo pulsante han permitido identificar 55 cromosomas en la cepa CL Brener de *T. cruzi*, aunque existen variaciones entre las distintas cepas (Branche et al. 2006).

Los genomas de los tripanosomátidos están organizados en largos *clusters* policistrónicos de genes (PGC, por sus siglas en inglés *Polycistronic Gene Cluster*), esto implica 10-100 genes codificantes para proteínas, no relacionadas funcionalmente, ordenados secuencialmente en la misma hebra de ADN. Esta organización tan inusual de los genes fue observada previamente en un cromosoma perteneciente a *L. major*.

La publicación de los genomas completos para *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* mostró que la mayoría de los genes en todos los cromosomas tripanosomátidos están organizados en largos PGCs (Martínez-Calvillo, Vizuet-De-Rueda, et al. 2010).

Los contenidos de los genomas de los TriTryps fueron comparados mediante análisis bioinformáticos y se observaron 6158 *clusters* de grupos ortólogos comunes y, adicionalmente, 458 compartidos entre *T. cruzi* y *T. brucei*; 482 entre *T. cruzi* y *L. major*, y 3.736 específicos para *T. cruzi* (Figura 8). Además se observó que los genomas de los tripanosomátidos secuenciados son altamente sinténicos, mostrando un orden génico muy conservado (Vazquez 2007).



**Figura 8.** Distribución de *Clusters* de Grupos Ortólogos (COGs) entre los TriTryps. Adaptado (El-Sayed, Myler, Blandin, et al. 2005).

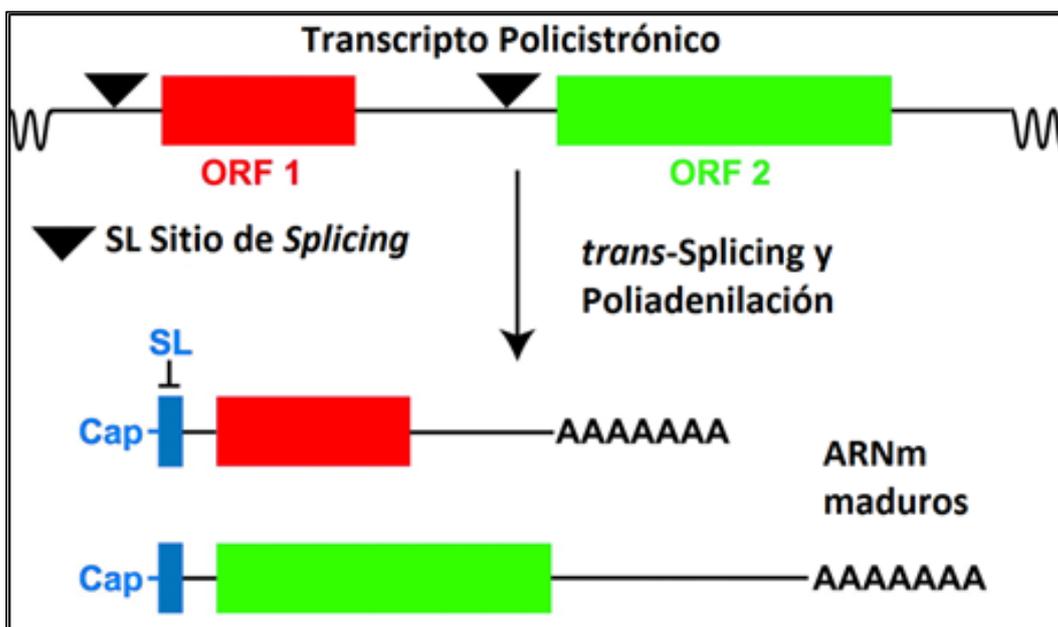
## ***Transcripción génica en T. cruzi***

El proceso de maduración del ARNm en *T. cruzi* difiere considerablemente de la mayoría de los eucariotas.

La presencia de promotores y otros elementos regulatorios es clave en las células eucariotas para lograr una fina regulación génica y controlar situaciones complejas como el desarrollo, la diferenciación y el establecimiento de un organismo pluricelular.

El parásito *T. cruzi* se caracteriza por la ausencia de promotores típicos para la ARN polimerasa II en los genes que codifican proteínas. La transcripción en tripanosomátidos comienza en unos pocos sitios dentro de los cromosomas, en donde la composición de histonas y la modificación de las mismas es diferente (Siegel et al. 2009).

El ARNm es expresado como una larga unidad de transcripción policistrónica (PTU por sus siglas en inglés, *Polycistronic Transcription Unit*) compuesta de genes que generalmente no codifican para proteínas funcionalmente relacionadas. Estas PTUs pueden llegar a ser tan largas como un cromosoma entero. Al final, las PTUs son procesadas hasta ARNm monocistrónicos a través de dos procesos acoplados: el *trans-splicing* y la poliadenilación (Figura 9). Finalmente los ARNm maduros son exportados al citoplasma para su traducción. Como consecuencia de este proceso, los genes se encuentran empaquetados densamente, separados por regiones intergénicas cortas (IR, por sus siglas en inglés *Intergenic Region*) que juegan un rol clave en el procesamiento y en los niveles de los ARNm (Matthews et al. 1994).



**Figura 9.** Proceso de maduración del ARNm en tripanosomátidos. Adaptado (Landfear 2003).

Tanto la poliadenilación como el *capping* pueden no llevarse a cabo en un lugar fijo de la IR, sino que pueden ocurrir en varios lugares dentro de un espacio acotado de la misma, influenciados por la presencia de trectos de polipirimidinas que interaccionan con aquellas proteínas involucradas en el proceso. En el parásito *T. cruzi*, el *trans-splicing* es un proceso que implica la adición de 39 nucleótidos estrictamente conservados, denominados mini-exón o *spliced leader* (SL), en el extremo 5' del ARNm, el cual es indispensable para poder ser traducido (Liang et al. 2003). La poliadenilación está coordinada con el *trans-splicing*, y a diferencia de los eucariotas superiores, no existe una señal específica en tripanosomátidos.

La co-transcripción de varios marcos abiertos de lectura resulta en la dependencia de mecanismos pos-transcripcionales para la regulación de la expresión génica. En la mayoría de los casos, los elementos regulatorios se encuentran en la región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés *UnTranslated Region*) del extremo 3' (Bayer-Santos et al. 2012). El estudio de las regiones 3' UTR de diferentes transcriptos ha revelado que muchas veces presentan más de un motivo regulatorio, permitiendo una regulación que involucra la combinación de múltiples factores, que puede darse simultánea, competitiva o temporalmente separados.

En algunos pocos casos, se ha reportado la presencia de intrones y de *cis-splicing* (Mair et al. 2000; Ivens et al. 2005), demostrando que ambos procesos co-existen en tripanosomas como ocurre en otros organismos capaces de realizar *trans-splicing*.

El parásito *T. cruzi* posee copias altamente conservadas de las tres ARN polimerasas eucariotas (Pol I, Pol II y Pol III). La ARN Pol III sintetiza todos los ARNs en tripanosomátidos, además de algunos ARNr y ARNt. Los parásitos no poseen ningún gen codificante para proteínas transcripto por la ARN Pol II, sin embargo se ha identificado asociado al mini-exón un promotor para la ARN Pol II y se ha propuesto que esta enzima es dirigida a dicha región por mecanismos epigenéticos y no por la presencia de una secuencia específica (Cribb & Serra 2009).

Debido a la ausencia de sitios de iniciación de la transcripción, la regulación de la expresión génica no sucede a nivel transcripcional, sino post-transcripcional, traduccional y post-traduccionalmente. La regulación post-transcripcional sucede por un mecanismo que involucra estabilización o desestabilización de los ARNm (Martínez-Calvillo, Vizuet-de-Rueda, et al. 2010).



## ***Herramientas para la manipulación genética de T. cruzi***

El conjunto de herramientas y técnicas genéticas disponibles incluye aquellas que permiten investigar la función génica por estrategias que involucran tanto la pérdida como la ganancia de la función como así también estudiar la localización de los productos génicos utilizando el marcado de proteínas *in vivo*.

Una de las herramientas más poderosas disponibles para el estudio de la función de los genes involucra el *knockdown* por ARN de interferencia (ARNi). A pesar de que este proceso existe en *T. brucei*, tanto el parásito *T. cruzi* como *L. major* carecen de componentes esenciales de la maquinaria de la ruta del ARNi, como la proteína *dicer* (El-Sayed, Myler, Blandin, et al. 2005; Darocha et al. 2004; Robinson & Beverley 2003). La ausencia del ARNi en *T. cruzi* introduce una limitación importante, por lo que el análisis de la función génica recayó durante muchos años exclusivamente en técnicas complejas y lentas como la generación de mutantes *knock-out* o dominantes negativos. En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas para reemplazar, modificar o eliminar genes en diversos organismos, y algunas han tenido resultados prometedores incluso en *Trypanosoma cruzi*, por ejemplo el sistema CRISPR-Cas9 (Xu et al. 2009; Peng et al. 2015; Lander et al. 2015).

## ***Vectores de expresión para T. cruzi***

El primer vector de expresión disponible para *T. cruzi* fue el pTEX, que no lleva secuencias promotoras pero contiene las regiones intergénicas (IRs) correspondientes al gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) rodeando un sitio múltiple de clonado y un marcador de resistencia para neomicina (G418) utilizado para seleccionar los parásitos. El pTEX se mantiene como un episoma circular de múltiples unidades cabeza-cola del plásmido original transfectado (Kelly et al. 1992).

Utilizando el esqueleto del pTEX se desarrolló una segunda generación de vectores de expresión con el vector pRIBOTEX, que lleva adicionado un promotor ribosomal fuerte para la transcripción por la ARN Pol I (Martínez-Calvillo et al. 1997). Por último, el pTRES incorporó una señal fuerte de *trans-splicing* río abajo del promotor ribosomal, denominada HX1 (Vazquez & Levin 1999). Estos dos últimos vectores se insertan por recombinación homóloga en el locus ribosomal, en lugar de ser mantenidos como episomas.

Si bien los tres vectores son sistemas de expresión constitutiva, se obtienen mayores niveles de expresión con el pRIBOTEX en comparación con el pTEX y a su vez, la presencia del HX1 en el pTRES hace que su expresión sea aún mucho mayor que en los dos anteriores.

Se ha desarrollado también un vector de expresión inducible, el pTcINDEX, que contiene un promotor para la ARN Pol del bacteriófago T7 reprimido por tetraciclina. Se requiere utilizar una cepa de *T. cruzi* que exprese constitutivamente la ARN Pol del bacteriófago T7 y el represor tetraciclina (Taylor & Kelly 2006).

En nuestro laboratorio se desarrollaron nuevos plásmidos (denominados pTRESL) provistos con diferentes marcadores de selección y múltiples epítopes de reconocimiento por anticuerpos comerciales, los cuales pueden ser utilizados para expresar proteínas y realizar marcaciones endógenas, entre otras aplicaciones (Bouvier et al. 2013).

## **Metabolismo de *Trypanosoma cruzi***

Como una consecuencia de la adaptación al parasitismo durante la evolución, los tripanosomátidos han desarrollado mecanismos de obtención de nutrientes diferentes a los hospedadores mamíferos. Primero, el parásito debe competir con sus hospedadores vertebrado e invertebrado para adquirir componentes esenciales del medio extracelular y por lo tanto debe desarrollar sistemas de transporte eficientes. Segundo, el ciclo de vida del parásito involucra dos hospedadores muy distintos, con ambientes con características físico-químicas diferentes en cuanto a nutrientes, pH, temperatura, composición iónica, etc. El parásito debe expresar sistemas de incorporación de nutrientes que se adapten a las fluctuaciones ambientales y además debe poder regularlos para modificar el nivel de incorporación de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes y/o el estadio del ciclo de vida. La capacidad de importar nutrientes esenciales es un componente importante de la patogénesis (Landfear 2011). El metabolismo energético de la mayoría de los tripanosomátidos depende de la disponibilidad de fuentes de carbono presente en sus hospedadores ya que no cuenta con sustancias de reserva como el glucógeno.

El estadio tripomastigote de *T. brucei* y *T. cruzi* utiliza preferencialmente glucosa, la cual es abundante en los fluidos de sus hospedadores vertebrados. Sin embargo, en los insectos hematófagos obtienen su energía de L-prolina y/o L-glutamina, que son los principales constituyentes de su hemolinfa y fluidos tisulares. En consecuencia, los estadios del ciclo de vida que transcurren en el insecto dependen del catabolismo de aminoácidos, especialmente de L-prolina para la obtención de energía (Bringaud et al. 2006).

El ciclo de las pentosas fosfato es otra ruta metabólica presente en estos parásitos. Se ha demostrado su funcionalidad en epimastigotes y se ha reportado la presencia de todas las enzimas en los diferentes estadios. Se postula que esta vía provee del NADPH necesario para los sistemas redox y para diversos procesos biosintéticos (Maugeri & Cazzulo 2004).

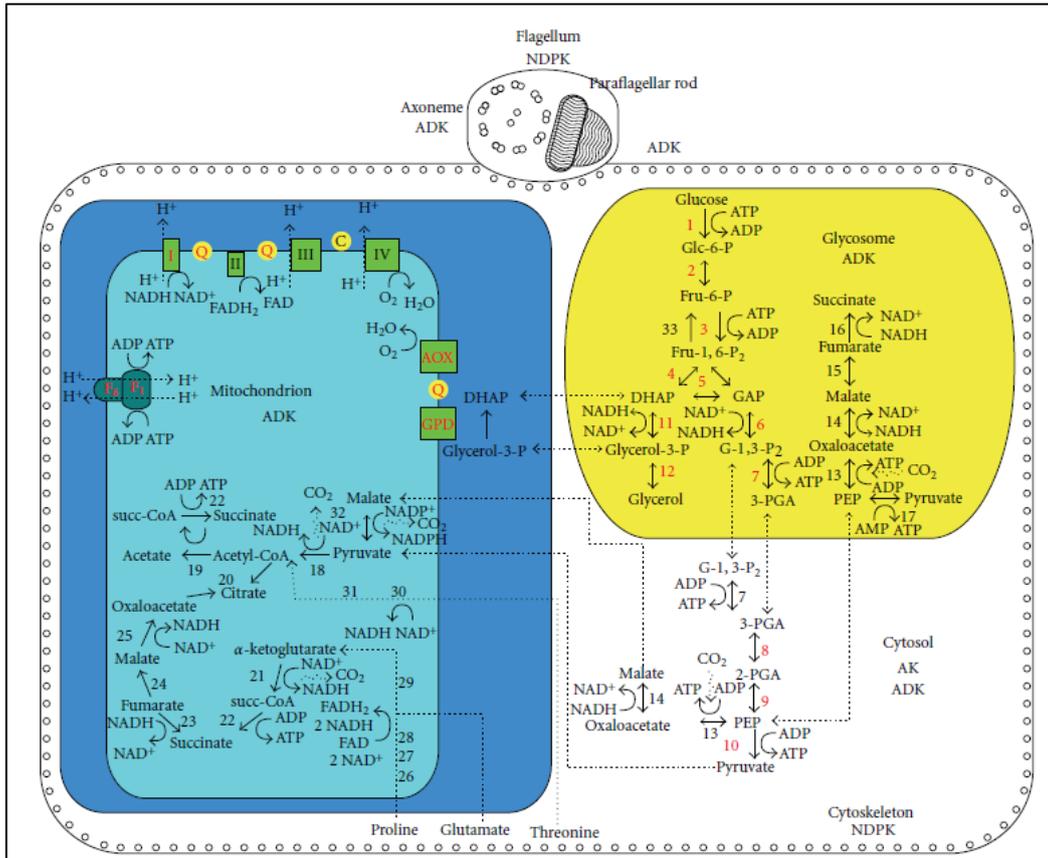
El metabolismo de ácidos grasos también ha sido estudiado en tripanosomátidos (Tripodi et al. 2006; Livore et al. 2007). El análisis de los genomas de los TriTryps mostró que serían capaces de sintetizar ácidos grasos y oxidarlos a través de la  $\beta$ -oxidación (van Hellemond & Tielens 2006; Berriman et al. 2005). Además, en estos organismos se ha reportado un mecanismo especializado para la síntesis de los mismos lo cual parece ser una adaptación a la vida parasítica (Lee et al. 2007).

### ***Metabolismo de glucosa***

La glucosa es incorporada a través de transportadores de hexosas, cuyo número varía según la especie de tripanosomátido; por ejemplo, sólo un transportador se ha descrito para *T. cruzi*, mientras que en *T. brucei* se describieron dos y en *Leishmania* spp. tres. Los transportadores de glucosa no sólo están involucrados en la captación de azúcares para llevar a cabo la glicólisis, sino que también participan en la regulación del flujo glicolítico (Bakker et al. 1999; Bakker et al. 2000).

El transporte de glucosa ha sido estudiado tanto en epimastigotes como en tripomastigotes sanguíneos. En amastigotes se ha demostrado que no captan glucosa del medio y de hecho, tampoco expresan el transportador de glucosa (Silber et al. 2009). Una vez en el citoplasma, la glucosa es transportada al glicosoma para ser oxidada (Figura 10). Dentro del glicosoma, cada molécula de glucosa es rápidamente convertida

en dos moléculas de gliceraldehído 1,3-bifosfato por las enzimas glicolíticas presentes en la organela. El gliceraldehído 1,3-bifosfato producido es transportado al citoplasma por un sistema no caracterizado y convertido a fosfoenolpiruvato (PEP), que puede seguir dos caminos: (a) conversión a piruvato, que puede ser translocado a la mitocondria para ingresar al ciclo de Krebs o puede ser transformado a alanina por transaminación en el citoplasma; y (b) conversión a oxalacetato mediante la carboxilación del PEP en el glicosoma. El oxalacetato resultante es finalmente convertido a malato, el cual es convertido a piruvato por una enzima citoplasmática o bien es transportado a la mitocondria, donde puede ser convertido a piruvato por una enzima mitocondrial y luego ser oxidado a través del ciclo de Krebs. Tanto el piruvato mitocondrial como el piruvato citoplasmático pueden ser aminados por una transaminasa dando como resultado alanina (Cazzulo et al. 1977; Cannata & Cazzulo 1984; Cazzulo 1992; Cazzulo 1994; Urbina 1994). Esto es consistente con estudios que demuestran la existencia de dos fuentes independientes de alanina (Frydman et al. 1990).



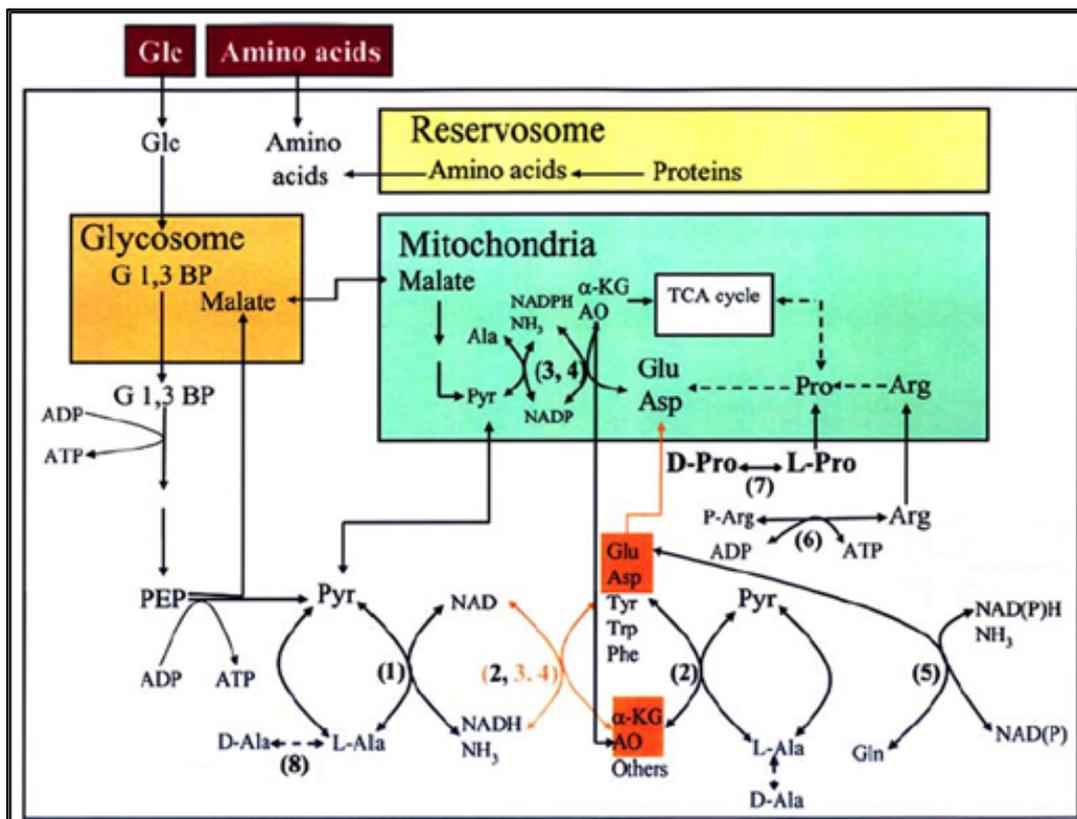
**Figura 10.** Representación esquemática del metabolismo energético en epimastigotes de *T. cruzi* (Pereira et al. 2011).

Las enzimas se encuentran numeradas: 1, hexoquinasa; 2, glucosa 6-fosfato isomerasa; 3, fosfofructoquinasa; 4, aldolasa; 5, triosa fosfato isomerasa; 6, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; 7, fosfoglicerato quinasa; 8, fosfoglicerato mutasa; 9, enolasa; 10, piruvato quinasa; 11, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa; 12, glicerol quinasa; 13, fosfoenolpiruvato quinasa; 14, malato deshidrogenasa; 15, fumarasa; 16, fumarato reductasa; 17, piruvato fosfato diquinasa; 18, complejo piruvato deshidrogenasa; 19, acetato:succinato CoA transferasa; 20, citrato sintasa; 21,  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa; 22, succinil-CoA sintetasa; 23, succinato deshidrogenasa; 24, fumarasa; 25, malato deshidrogenasa; 26, prolina oxidasa; 27,  $\Delta$ -pirrolina 5-carboxilato reductasa; 28, glutamato semialdehído deshidrogenasa; 29, glutamato deshidrogenasa; 30, treonina deshidrogenasa; 31, acetil-CoA:glicina C-acetiltransferasa; 32, malato deshidrogenasa NADP-dependiente; 33, fructosa 1,6-bisfosfatasa. Las enzimas en color rojo están presentes sólo en la forma tripomastigote sanguíneo; las presentes en la forma procíclica se muestran en color rojo y negro. AOX: oxidasa alternativa; GPD: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD; I: oxidorreductasa NADH:ubiquinona (complejo I); II: succinato deshidrogenasa (complejo II); III: citocromo C reductasa (complejo III); IV: citocromo C oxidasa (complejo IV); c: citocromo C; Q: ubiquinona; F0/F1: F0/F1 ATP sintasa; Glc-6-P: glucosa 6-fosfato; Fru-6-P: fructosa 6-fosfato; Fru-1,6-P<sub>2</sub>: fructosa 1,6-bisfosfato; GAP: gliceraldehído 3-fosfato; G-1,3-P<sub>2</sub>: 1,3-bisfosfoglicerato; 3-PGA: 3-fosfoglicerato; 2-PGA: 2-fosfoglicerato; PEP: fosfoenolpiruvato; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; Glicerol-3-P: glicerol 3-fosfato; succ-CoA: succinil-coenzima A; acetil-CoA: acetil-coenzima A.

## Metabolismo de aminoácidos

Los aminoácidos pueden obtenerse de tres fuentes principales: biosíntesis a partir de metabolitos precursores, transporte activo del medio o degradación de proteínas.

Está demostrado que *T. cruzi* puede metabolizar al menos los aminoácidos prolina, glutamina, glutamato, isoleucina, asparagina y aspartato (Figura 11). Se cree que todos estos aminoácidos son oxidados a través de su conversión a glutamato o aspartato, que luego pueden ser transportados desde el citoplasma a la mitocondria y ser procesados vía ciclo de Krebs (Silber et al. 2005). Además se ha demostrado en cultivos axénicos que la prolina, el glutamato y el aspartato están involucrados en la diferenciación de epimastigote a tripomastigote en el vector triatomino (Contreras et al. 1985).



**Figura 11.** Representación esquemática de las rutas metabólicas de aminoácidos en *T. cruzi* (Silber et al. 2005). Las líneas sólidas representan vías o reacciones que han sido demostradas bioquímicamente. Las líneas punteadas representan posibles rutas o reacciones inferidas por el proyecto del genoma de *T. cruzi*.

Glc: Glucosa; G 1,3 BP: gliceraldehído 1, 3-bifosfato; PEP: fosfoenolpiruvato; OA: ácido oxalacético;  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -cetoglutarato; TCA: ciclo de ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs); 1: alanina aminotransferasa (ALAT); 2: tirosina aminotransferasa (TAT); 3: glutamato deshidrogenasa; 4: aspartato aminotransferasa; 5: glutamina sintetasa; 6: arginina quinasa; 7: prolina racemasa; 8: alanina racemasa

El grupo  $-\text{NH}_2$  del glutamato puede ser transferido al piruvato por la alanina aminotransferasa (ALAT) y, en menor medida, por la tirosina aminotransferasa (TAT), dando como producto  $\alpha$ -cetoglutarato y alanina. En consecuencia, cuando la glicólisis es activa, se produce alanina. Otra vía por la cual el glutamato es convertido en  $\alpha$ -cetoglutarato es a través de la glutamato deshidrogenasa, produciendo amonio ( $\text{NH}_4$ ).

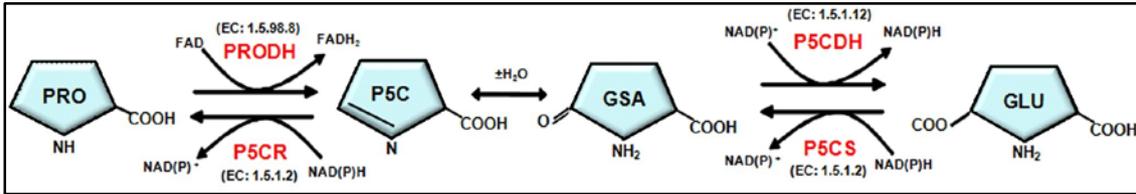
Esto explicaría las altas concentraciones de  $\text{NH}_4$  presentes en medios de cultivo condicionados. El aspartato provee al ciclo de Krebs con intermediarios a través de una aspartato aminotransferasa (ASAT). Esta enzima transfiere el grupo  $-\text{NH}_2$  del aspartato al  $\alpha$ -cetoglutarato, dando como resultado glutamato y oxalacetato. Se ha demostrado que la enzima TAT posee actividad aspartato aminotransferasa y además puede transaminar los tres aminoácidos aromáticos y alanina. Entre los grupos aceptores se encuentran el piruvato (convertido a alanina),  $\alpha$ -cetoglutarato (convertido a glutamato) y oxalacetato (convertido a aspartato), aunque el más relevante es el piruvato (Montemartini et al. 1993; Montemartini et al. 1995). La enzima TAT es una enzima clave en la biosíntesis de estos aminoácidos (Nowicki & Cazzulo 2008).

Por otro lado, *T. cruzi* cuenta con un sistema de regeneración rápida de ATP basado en el fosfógeno fosfoarginina. La fosfoarginina, que consiste en la arginina en su forma fosforilada puede ser utilizada como reservorio de energía, y permite a las células funcionar con bajos niveles de ATP ya que acumula un fosfato de alta energía que puede transferir rápidamente al ADP para generar ATP en situaciones de alto consumo energético celular. Este sistema es particularmente relevante ya que los tripanosomátidos carecen de sustancias de reserva en forma de hidratos de carbono y esta ruta metabólica se encuentra completamente ausente en mamíferos (Pereira et al. 2000).

### ***Metabolismo de prolina***

La prolina constituye una de las principales fuentes de carbono para la mayoría de los tripanosomátidos. Estudios metabólicos han demostrado que en epimastigotes la prolina puede ser convertida en cinco intermediarios del ciclo de Krebs (citrato, isocitrato, malato, succinato y oxalacetato), piruvato y los aminoácidos glutamato y aspartato que son rápidamente metabolizados. La prolina es oxidada a pirrolín-5-carboxilato (P5C) por una prolina deshidrogenasa mitocondrial (ProDH), que regula el estado redox de la célula y el metabolismo respiratorio, y que involucra la reducción de FAD a  $\text{FADH}_2$  (Figura 12) (Paes et al. 2013). El paso siguiente involucra una reacción no enzimática en la cual el anillo pirrólico del P5C se abre espontáneamente, dando como producto glutamato- $\gamma$ -semialdehído ( $\gamma$ GS). El motivo carbonilo del  $\gamma$ GS es oxidado a

ácido glutámico por la enzima  $\Delta^1$ -pirrolín-5-carboxilato-deshidrogenasa (P5CDH), y además conlleva la reducción de  $\text{NAD(P)}^+$  a  $\text{NAD(P)H}$  (Mantilla et al. 2015).



**Figura 12.** Metabolismo de prolina en *T. cruzi*. Adaptado de Paes et al. 2013.

Abreviaturas: PRO, prolina; PRODH, prolina deshidrogenasa; P5CR, pirrolín-5-carboxilato reductasa; P5C, pirrolín-5-carboxilato; GSA, semialdehído glutámico; P5CDH, pirrolín-5-carboxilato deshidrogenasa; P5CS, pirrolín-5-carboxilato sintasa; GLU, glutamato;  $\text{NAD(P)}^+$ , nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) oxidado;  $\text{NAD(P)H}$ , nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)reducido; FAD, flavín adenín dinucleótido oxidado;  $\text{FADH}_2$ , flavín adenín dinucleótido reducido.

La prolina, junto al glutamato y el aspartato, está involucrada en el proceso de metacicloogénesis, que consiste en la diferenciación de epimastigote a tripomastigote metacíclico en el vector triatomino (Contreras et al. 1985; Homsy et al. 1989). Además se demostró que la prolina participa en la diferenciación de epimastigotes intracelulares a tripomastigotes sanguíneos en el hospedador mamífero, paso esencial para el establecimiento de la infección (Tonelli et al. 2004). Asimismo la prolina aporta la energía necesaria para llevar a cabo la invasión celular por los tripomastigotes metacíclicos en el hospedador mamífero (Martins et al. 2009).

También hay evidencias de la participación de la prolina en mecanismos de resistencia a distintos estreses en el parásito *T. cruzi*, como estrés oxidativo y nutricional, y en la osmorregulación (Magdaleno et al. 2009; Paes et al. 2013; Rohloff et al. 2003; Rohloff & Docampo 2009).

Por último, se ha reportado la existencia de dos prolina racemasas, indicando la posibilidad de metabolizar no sólo L-prolina, sino también D-prolina (Reina-San-Martín et al. 2000; Chamond et al. 2003). Reforzando la idea del metabolismo de D-aminoácidos, también se han encontrado dos ORFs codificantes para alanina racemasas (El-Sayed, Myler, Bartholomeu, et al. 2005; Silber datos sin publicar).



# Sistemas de transporte de metabolitos

## Generalidades

Los sistemas de transporte cumplen una función esencial en todos los organismos vivos ya que: (1) permiten la entrada y salida de nutrientes de la célula y de sus compartimentos intracelulares; (2) regulan las concentraciones citoplasmáticas de metabolitos por mecanismos secretorios; (3) mediante el flujo activo previenen el efecto nocivo de toxinas y drogas; (4) exportan macromoléculas tales como carbohidratos complejos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; (6) mantienen la concentración osmótica celular; y (7) catalizan el ingreso y egreso de moléculas señal que median la comunicación intercelular (Busch & Saier, 2002). En su mayoría, los procesos de transporte transmembrana son mediados por proteínas integrales, muchas de las cuales funcionan en conjunto con receptores extra-citoplásmicos o dominios de receptores, así como también con proteínas regulatorias. Cada complejo de estas proteínas o dominios de proteínas es referido como un sistema de transporte. Entonces, un sistema de transporte es una proteína o un complejo proteico que cataliza una reacción vectorial, independientemente de la catálisis de una reacción química o de una reacción de transferencia de electrones que impulsa el proceso vectorial.

El transporte de solutos orgánicos como azúcares, aminoácidos, péptidos, neurotransmisores y drogas a través de las membranas celulares procede vía transportadores activos y pasivos especializados (Figura 13).

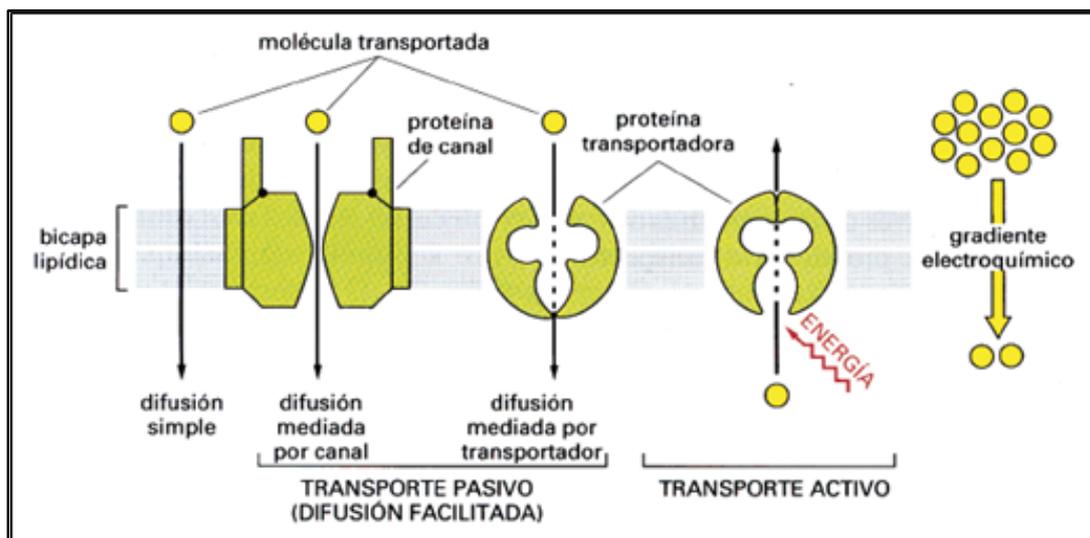


Figura 13. Transportadores de membrana (Alberts et al. 2002).

Los transportadores activos acoplan el transporte de solutos al consumo de energía y pueden dividirse en dos clases: transporte acoplado a iones y transporte ATP-dependiente. El transporte acoplado a iones utiliza gradientes electroquímicos para traslocar solutos. En general estos transportadores usan el simporte de  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y/o el antiporte de  $K^+$ . El gradiente electroquímico es mantenido por  $H^+$  o  $Na^+/K^+$ -ATPasas localizadas en las membranas celulares. Los transportadores ATP-dependientes son energizados directamente por la hidrólisis de ATP y traslocan sustratos heterogéneos. El transporte pasivo incluye el transporte facilitado y los canales, que permiten la difusión de solutos a través de las membranas (Hediger 1994).

La difusión facilitada implica el movimiento de las moléculas en la dirección determinada por sus concentraciones relativas dentro y fuera de la célula. No interviene ninguna fuente de energía externa; el tránsito de solutos es mediado por proteínas que permiten a las moléculas transportadas atravesar la membrana sin interaccionar directamente con su interior hidrofóbico. Las proteínas canal forman poros abiertos a través de la membrana y permiten la libre difusión de cualquier molécula del tamaño y carga apropiados (Cooper & Hausman 2007).

### ***Transportadores en Trypanosoma cruzi***

En muchos casos, los procesos de transporte son el primer paso de una ruta metabólica y de ellos depende la disponibilidad de sustratos dentro de la célula. Una de las características comunes a los organismos parasitarios es el probable reemplazo durante la evolución de las rutas biosintéticas anabólicas por sistemas de transporte. Los transportadores pueden ser considerados sensores ambientales celulares, respondiendo a la presencia de sus moléculas sustrato en el medio extracelular, y haciendo posible su disponibilidad para procesos fisiológicos. Esto es particularmente importante en organismos que han de soportar un amplio rango de variaciones en su entorno, como el parásito *T. cruzi* (Bouvier et al. 2004).

Las propiedades cinéticas, termodinámicas y mecánicas de los procesos de transporte determinan la disponibilidad de un sustrato en el medio intracelular. Esto hace que la caracterización de los transportadores sea una meta importante en la investigación metabólica y el diseño de drogas (Gaspar E Canepa et al. 2004).

## **Transporte de glucosa**

El parásito *T. cruzi* no posee reservas intracelulares de glucosa en forma de glucógeno o almidón y dado que este carbohidrato es la fuente de carbono principal en los estadios presentes en el hospedador mamífero, la glucosa debe ser importada del entorno, por ejemplo desde la sangre del mamífero, a través de algún sistema transportador de glucosa (Barrett et al. 1998).

Por el momento se ha descrito un único sistema de transporte de glucosa en *T. cruzi*, presente tanto en epimastigotes como en tripomastigotes. Se trata de un sistema de difusión facilitada, con alta afinidad por la glucosa, que también reconoce D-fructosa y está relacionado con los que se han encontrado en *Leishmania* spp., *T. brucei*, *T. vivax* y *Crithidia fasciculata* (Tetaud et al. 2000; Tetaud et al. 1997; Barrett et al. 1998; Pereira & Silber 2012).

## **Transporte de poliaminas**

Las poliaminas catiónicas, como la putrescina, cadaverina, espermina y espermidina se requieren para múltiples procesos biológicos como el crecimiento celular, desarrollo, síntesis de proteínas, y para progresar a lo largo del ciclo de vida (Landfear 2011). La mayoría de los organismos sintetiza su propia putrescina a partir de ornitina por acción de la ornitina decarboxilasa (ODC) o, en plantas y bacterias, a partir de arginina (vía agmatina) por acción de la arginina decarboxilasa (ADC) (Tabor & Tabor 1984). Sin embargo, muchas células poseen además sistemas dependientes de energía para incorporar di- y poliaminas. Éstos pueden ser utilizados para suplementar la síntesis *de novo* con la captación de di- y poliaminas desde el ambiente; en particular, en respuesta a una amplia variedad de factores de crecimiento, hormonas y otros estímulos que provocan el crecimiento celular o cuando la síntesis *de novo* se encuentra bloqueada (Seiler et al. 1996).

En contraste con otros tripanosomátidos, el parásito *T. cruzi* es auxótrofo para la síntesis *de novo* de poliaminas ya que carece de las enzimas ADC y ODC para sintetizar putrescina (Carrillo et al. 1999; Carrillo et al. 2003); sin embargo sí posee las enzimas necesarias para convertir la putrescina, una vez ingresada, en espermidina y espermina (Birkholtz et al. 2011). Es por esto que la disponibilidad intracelular de poliaminas depende

exclusivamente de procesos de transporte. Al respecto, en *T. cruzi* fueron caracterizados bioquímicamente dos sistemas con alta afinidad para las diaminas putrescina y cadaverina y de baja afinidad para espermina y espermidina (Gonzalez et al. 1992; Le Quesne & Fairlamb 1996). Estos sistemas se regulan por las condiciones de crecimiento y son de particular importancia ya que las poliaminas son precursoras en la síntesis de tripanotión, un conjugado de glutatión-espermidina fundamental para el equilibrio redox intracelular en tripanosomátidos (Krauth-Siegel et al. 2003). Esto destaca la importancia de los sistemas de transporte para cubrir las necesidades metabólicas del parásito.

El primer gen codificante para un transportador de poliaminas eucariota fue clonado en *Leishmania major*, y al realizar una búsqueda bioinformática en *T. cruzi* se identificaron dos ORFs con 41% de identidad de secuencia aminoacídica con respecto a éste, y 95% de identidad entre ellos (Hasne & Ullman 2005; Hasne et al. 2010).

Posteriormente en nuestro laboratorio se identificó el gen TcPAT12 (GeneDB: TcCLB.504213.110) como transportador de poliaminas, primero mediante estudios de expresión en ovocitos de *Xenopus laevis* y más recientemente por sobre-expresión en el parásito *T. cruzi* (Carrillo et al. 2006; Reigada et al. 2016).

## **Transporte de aminoácidos**

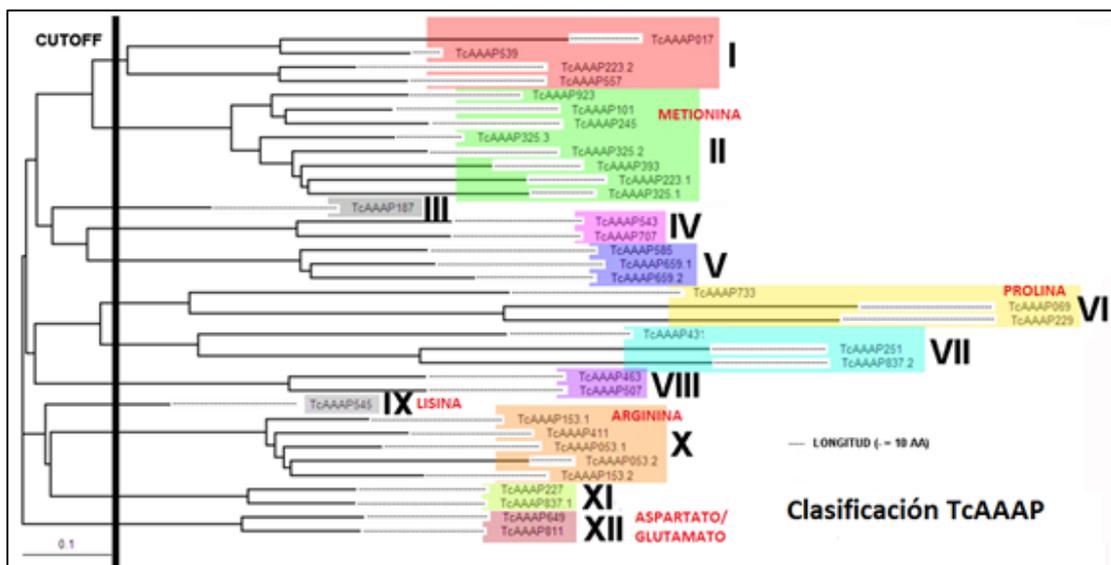
Los transportadores de aminoácidos son las primeras proteínas que entran en contacto con los solutos del entorno del parásito, y en numerosos casos funcionan no sólo como permeasas sino también como sensores ambientales. Como ya se ha mencionado anteriormente, los aminoácidos pueden ser obtenidos por biosíntesis a partir de precursores metabólicos, por transporte activo desde el medio o por degradación de proteínas. En muchos casos los procesos de biosíntesis fueron parcial o totalmente reemplazados en la evolución por procesos de transporte.

Existen varios trabajos sobre descripciones bioquímicas de los procesos de transporte de aminoácidos en tripanosomátidos. Se ha identificado un sistema de transporte de aspartato de alta afinidad, que también puede transportar glutamato. La actividad de este transportador es sensible al pH, registrándose incrementos en la actividad a medida

que el pH disminuye desde 8 a 4 (Canepa et al. 2005). Esta característica es común a casi todos los transportadores de aminoácidos caracterizados hasta el momento.

También se estudió el transporte de cisteína, observándose que se trata de un transporte altamente específico, ya que no se inhibe en presencia de otros aminoácidos como metionina, arginina, glutamato, prolina, glicina y serina (Canepa et al. 2009).

Utilizando datos preliminares del genoma no ensamblado de *T. cruzi*, se realizaron análisis bioinformáticos buscando posibles genes codificantes para transportadores de aminoácidos en el parásito. De este modo se identificó a la familia de transportadores de aminoácidos y derivados AAAP (*Amino Acid/Auxin Permease*) como la más representada en el genoma, abarcando permeasas con características de simporters H<sup>+</sup>/aminoácido. De esta forma, se identificaron como miembros de la familia TcAAAP 36 posibles transportadores de aminoácidos, los cuales fueron agrupados en 12 grupos principales con identidad de más del 70% dentro de cada grupo (Figura 14) (Bouvier et al. 2004). La presencia de tantos genes codificantes para una misma familia de transportadores de aminoácidos corrobora la importancia de estas proteínas en la biología del parásito *T. cruzi*.



**Figura 14.** Clasificación de los genes TcAAAP (Bouvier et al. 2004). Los genes fueron nombrados de acuerdo al organismo *T. cruzi* (Tc), la familia del transportador (AAAP), y los tres últimos números del ID sistemático de la base de datos de genes TriTrypDB, (<http://www.tritrypdb.org/>).

La primera caracterización molecular y funcional de un transportador de aminoácidos de *T. cruzi* fue realizada en nuestro laboratorio y consistió en la identificación del miembro de la familia TcAAAP denominado TcAAP7 (previamente TcAAAP545) como un

transportador de lisina de alta afinidad mono-específico. Esta especificidad de sustrato representa una importante diferencia con respecto al insecto vector y al hospedador mamífero, cuyas permeasas co-transportan lisina y arginina, ya que poseen transportadores generales de aminoácidos catiónicos (Inbar et al. 2012).

Respecto al transporte de arginina se han caracterizado dos sistemas de transporte de arginina en *T. cruzi*, siendo uno de baja afinidad y otro de alta afinidad, y en nuestro laboratorio hemos identificado, por expresión heteróloga en levaduras y por sobre-expresión en epimastigotes de *T. cruzi*, un transportador de arginina denominado TcAAAP411 (Pereira et al. 1999; Gaspar E. Canepa et al. 2004; Carrillo et al. 2010; Miranda et al. 2012). Al igual que el transportador de lisina, esta permeasa presenta una elevada especificidad por su sustrato, arginina, y sugiere que en la familia TcAAAP predominan los transportadores mono-específicos.

La importancia de encontrar y confirmar la presencia de proteínas pertenecientes a la familia AAAP en *T. cruzi* radica en la ausencia de estas permeasas en mamíferos, y en consecuencia, se propuso que estos transportadores podrían ser blancos prometedores para drogas terapéuticas (Carrillo et al. 2010).

### **Transporte de prolina**

Se han caracterizado dos sistemas de transporte para prolina en *T. cruzi*, el sistema A de alta afinidad ( $K_m = 0.31$  mM), y el sistema B de baja afinidad ( $K_m = 1.36$  mM). Ambos transportes son activos e independiente de cationes  $Na^+$  o  $K^+$ , pero uno utiliza ATP como fuerza impulsora (sistema B), mientras que el otro utiliza un gradiente de  $H^+$  a través de la membrana plasmática (sistema A) (Silber et al., 2002). Si bien se ha reportado la inhibición de ambos sistemas ante la presencia de algunos aminoácidos, cada sistema presentó una respuesta única y no necesariamente igual, y además demostraron ser estereoespecíficos ya que el isómero D-prolina no modificó el transporte para ninguno de los sistemas. Teniendo en cuenta que el ciclo de vida del parásito se desarrolla en ambientes que presentan condiciones muy diferentes en cuanto a pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes entre otras, no sorprende encontrar más de un sistema de transporte, presentando diferentes afinidades, y por ende, teniendo la capacidad de funcionar en diferentes contextos.

# **Hipótesis y Objetivos**

---

La hipótesis de este trabajo es que la inhibición del transporte de prolina (y por lo tanto de su disponibilidad intracelular) produce la pérdida de viabilidad de los parásitos.

El objetivo general de este trabajo es la caracterización funcional del transportador de prolina del parásito *T. cruzi* y su participación en la regulación de procesos tales como la resistencia a estrés y drogas tripanocidas. A partir de los datos obtenidos se buscarán compuestos capaces de inhibir dicho transporte y que posean acción tripanocida.

Los objetivos específicos que se plantean son:

- Identificación y validación del gen correspondiente al transportador de prolina de *T. cruzi* mediante complementación en levaduras.
- Generación de parásitos transgénicos que sobre-expresen el transportador para posteriores ensayos funcionales.
- Análisis de la actividad y especificidad de la permeasa.
- Rol del transporte de prolina en el metabolismo energético.
- Estudio de la respuesta a estrés y a drogas tripanocidas.
- Estudio de la regulación del transportador de prolina.
- Prueba de diferentes análogos de prolina como posibles inhibidores del transporte de dicho aminoácido y su análisis como agentes tripanocidas.



# **Materiales y Métodos**

---

## ***Soluciones y medios utilizados***

**Medio LB:** NaCl 5 g/l; Extracto de Levadura 5 g/l; Triptona 10 g/l. Para los medios sólidos se utilizó 2% de Agar. Para las placas con antibiótico se utilizó ampicilina (100 µg/ml). Para placas de selección de colonias “blancas/azules” se colocó en las placas X-Gal (0,2% concentración final) e IPTG (0,4 mM concentración final).

**Medio YPD:** Extracto de levadura 10 g/l; Peptona 20 g/l; Glucosa 20 g/l. Para los medios sólidos se utilizó 3% agar. Las placas fueron suplementadas con ampicilina (100 µg/ml).

**Medio SC (completo):** Base nitrogenada de levaduras (YNB, sin aminoácidos ni amonio) 6.7 g/l; Glucosa 20 g/l; Adenina, Arginina, Cisteína, Leucina, Lisina, Treonina, Triptofano 0.1 g/l c/u; Aspartato, Histidina, Isoleucina, Metionina, Fenilalanina, Prolina, Serina, Tirosina, Valina 0.05 g/l c/u. Para los medios sólidos se utilizó 3% agar. Las placas fueron suplementadas con ampicilina (100 µg/ml).

**Medio Mínimo (MM):** Base nitrogenada de levaduras (YNB, sin aminoácidos ni amonio) 1.7 g/l; Glucosa 20 g/l. Para los medios sólidos se utilizó 3% agar. Las placas fueron suplementadas con ampicilina (100 µg/ml). Este medio se utilizó para seleccionar levaduras transformadas en base a la complementación de auxotrofia de uracilo.

**Medio Mínimo (MM) +Pro:** Base nitrogenada de levaduras (YNB, sin aminoácidos ni amonio) 6.7 g/l; Glucosa 20 g/l; Prolina 0.1 mM. Para los medios sólidos se utilizó 3% agar. Las placas fueron suplementadas con ampicilina (100 µg/ml).

**Medio BHT:** Extracto Cerebro-Corazón 33 g/l; Triptosa 5 g/l; KCl 0.4 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g/l; Glucosa 0.3 g/l. Llevar a pH 7.4. Antes de utilizar se completó con Suero Fetal Bovino 10%, Estreptomicina 100 µg/ml, Penicilina 100 U/ml y Hemina 20 µg/ml.

**Medio SOB:** NaCl 0.5 g/l; Triptona 20 g/l; Extracto de levadura 5 g/l; KCl 1M 2.5 ml. pH 7. Antes de usar el medio, se agregó MgCl<sub>2</sub> 2M 5 ml/l.

**Buffer TAE 50X:** Tris Base 242 g/l; Ácido Acético Glacial 57.1 ml/l; EDTA 0.5 M (pH8) 100 ml/l.

**Buffer de Siembra 6X (Loading Buffer):** Azul de Bromofenol 0.25% p/v; Xileno cianol 0.25% p/v; Glicerol 30%.

**Buffer Taq 1X:** KCl 5 mM; Tris-HCl (pH 9) 10 mM; TritonX-100 0.1%.

**Solución PI:** Tris-HCl (pH 8) 25 mM; EDTA (pH 8) 10 mM; Glucosa 50 mM.

**Solución PII:** NaOH 0.2 N; SDS 1%.

**Solución PIII:** Acetato de Potasio (pH 4,8) 3 M.

**PBS 10X:** KCl 2 g/l; NaCl 80 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.1 g/l.

**Buffer TE 1X:** Tris-HCl 10 mM (pH 8); EDTA (pH 8) 1 mM.

**Buffer TE/AcLi:** TE 1X; Acetato de Litio 100 mM.

**Buffer TE/AcLi/PEG<sub>4000</sub>:** TE 1X; Acetato de Litio 100 mM; PEG<sub>4000</sub> 40%.

**PIC:** Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 equilibrado con buffer Tris.

**Cracking Buffer 5X:** Glicerol 50% v/v; DTT 7.7% p/v; SDS 10% p/v; Tris-HCl pH 6.8 0.4 M; Azul de Bromofenol 0.002% p/v.

**Rojo Ponceau:** 0.2% Ponceau S; 0.5% Ácido Acético. Llevar a volumen con agua.

**Buffer de Electroporación:** PBS 1X; MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM; CaCl<sub>2</sub> 0.1 mM.

**Buffer Tris-Glicina-SDS:** Tris Base 30.3 g/l; Glicina 144 g/l.

**Buffer de Transferencia 10X:** Tris Base 30.3 g/l; Glicina 144 g/l; Metanol 20%.

**Buffer T-PBS:** PBS 1X; Tween20 0.05%.

**Buffer T-PBS-leche:** PBS 1X; Tween20 0.05%; Leche Descremada en polvo 5%.

**Buffer de lisis para parásitos:** Tris 10 mM pH 7.5; EDTA 100 mM; SDS 0.1%.

**Buffer INOUE:** MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10.88 g/l; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.2 g/l; KCl 18.65 g/l; PIPES (0.5 M pH 6.7) 10 ml/l. Llevar a volumen con agua destilada y esterilizar por filtración.

**Solución de tinción con azul de Coomasie:** Coomassie R250 0.25% (v/v); Metanol 30%; Ácido Acético Glacial 10%.

**Solución de destinción:** Metanol 50%; Ácido Acético Glacial 10%; Agua 40%.

## ***Manipulación de microorganismos***

### ***Cultivo de epimastigotes de Trypanosoma cruzi***

Se utilizaron las cepas de *Trypanosoma cruzi* MJ-Levin (MJL) e Y (DTUs TcI y TcII respectivamente). Los epimastigotes de las diferentes cepas fueron cultivados en 5 ml de medio de cultivo BHT a 28 °C en botellas de 25 cm<sup>2</sup>.

Los repiques de mantenimiento se llevaron a cabo cada 7 a 10 días inoculando medio fresco con epimastigotes según un factor de 1:100 respecto del cultivo parental para la

cepa MJL y 1:10 para la cepa Y. Los epimastigotes transgénicos se cultivaron en las mismas condiciones con el agregado de neomicina (500 µg/ml).

Para evaluar el estado y densidad de los cultivos de parásitos se los observó en el microscopio utilizando una cámara hemocitométrica (cámara de Neubauer).

### ***Cultivo de levaduras***

Las levaduras utilizadas se crecieron en placas de cultivo con el medio de selección correspondiente. Además se agregó ampicilina a fin de disminuir la posibilidad de contaminaciones.

***Saccharomyces cerevisiae* cepa MG266:** gap1-1, put4-1.

***Saccharomyces cerevisiae* cepa YOR348c:** MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YOR348c::kanMX4.

### ***Cultivo de bacterias***

Las bacterias se crecieron en placas de cultivo o en tubos de 15 ml o 50 ml. En el caso de bacterias transformadas con plásmidos, se agregó el antibiótico correspondiente.

***Escherichia coli* cepa DH5α:** F-φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-.

## ***Técnicas de biología molecular***

### ***Bacterias competentes***

Se inocularon tres erlenmeyers conteniendo 250 ml de medio SOB con 10 ml, 4 ml y 2 ml de un cultivo de *Escherichia coli* saturado, respectivamente. Se incubaron a 18-22 °C con agitación moderada. La densidad óptica fue monitoreada a 600 nm y el primer cultivo en alcanzar una absorbancia de 0.55 OD<sub>600</sub>/ml fue colocado en hielo por 10 minutos. Se cosecharon las células por centrifugación a 2500 x g durante 10 minutos a 4 °C. Luego se resuspendieron las bacterias suavemente en 80 ml de solución Inoue fría. Nuevamente se centrifugó la suspensión a 2500 x g durante 10 minutos a 4 °C y las bacterias fueron suavemente resuspendidas en 20 ml de solución Inoue fría. Se agregaron 1.5 ml de DMSO, se dividió la suspensión en alícuotas en tubos estériles, los cuales fueron inmediatamente congelados en un baño de nitrógeno líquido. Los tubos se almacenaron a -70 °C hasta su utilización (Inoue et al. 1990).

### ***Transformación de bacterias***

Las bacterias fueron transformadas por el método de “Shock-Térmico”: las bacterias competentes fueron incubadas con el ADN durante 15 minutos en hielo y sometidas a un golpe térmico a 42 °C durante 90 segundos. Rápidamente fueron recuperadas con el agregado de 1 ml de medio LB incubando a 37 °C por 15 minutos. Finalmente fueron centrifugadas a baja velocidad y sembradas en placas con LB agar conteniendo el antibiótico correspondiente. Se realizaron controles de viabilidad.

### ***Levaduras electrocompetentes***

Se inocularon 50 ml de medio YPD con la levadura deseada y se dejó crecer a la temperatura adecuada con agitación durante la noche. Se cosecharon las células por centrifugación a 2500 x g durante 5 minutos. Las células fueron lavadas 3 veces con agua fría estéril y luego 2 veces con glicerol 10% frío. Por último se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 1 ml de glicerol 10% frío y se mantuvieron en hielo hasta su uso.

### ***Electroporación de levaduras***

Se mezclaron 50 µl de levaduras electrocompetentes con 50 µg del plásmido correspondiente en una cubeta de electroporación. Se realizó la electroporación con los siguientes parámetros: 2.5 volts, 25 µF y 250 Ω. Las células se recuperaron agregando inmediatamente 1 ml de medio YPD e incubando a la temperatura adecuada durante 30 minutos. Se plaquearon 150 µl de la transformación en placas con el medio de cultivo adecuado y se colocaron en estufa. Se realizaron controles de cepa y de viabilidad.

### ***Transformación de levaduras por Acetato de Litio***

Se utilizó un protocolo adaptado del método de litio/polietilenglicol (Gietz et al. 1995). Se inocularon 50 ml de medio YPD con 0.3 OD de un cultivo de levaduras de la cepa deseada crecido durante toda la noche a temperatura adecuada. Una vez que el nuevo cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento, se lavó con 10 ml de buffer TE, se concentró a 1 OD/100 µl con buffer TE/AcLi y se incubó a 30 °C con agitación suave durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de 100 µl de la suspensión celular a las que se añadió una solución que contenía el ADN plasmídico diluido en buffer TE con 1 mg/ml de ADN de esperma de salmón. Se agregaron 700 µl de una solución TE/AcLi/PEG<sub>4000</sub> a cada reacción de transformación, y luego se incubó a 30 °C por 30 minutos. A continuación se agregaron 88 µl de DMSO y se incubó 10 minutos a 42 °C. Después se lavó dos veces con buffer TE, se resuspendió en 100 µl del mismo buffer y se procedió a inocular placas de cultivo. Se realizaron controles de cepa y viabilidad.

## ***Ensayos de complementación en levaduras***

Para la selección de las levaduras MG266 se prepararon placas conteniendo un medio mínimo (MM) con prolina como única fuente de carbono. Como control de viabilidad se utilizó el medio rico YPD.

Para la selección de las levaduras YOR348c se prepararon placas conteniendo un medio mínimo con los aminoácidos leucina, histidina y metionina (MM +Leu+His+Met). El plásmido de expresión p416 complementa la auxotrofia de uracilo porque posee el gen de la orotidin-5-fosfato decarboxilasa (URA3). Como control de viabilidad se utilizó medio YPD, y como control de cepa se plaquearon en medio MM -URA levaduras sin transformar.

## ***Electroporación de epimastigotes de T. cruzi***

Aproximadamente  $10^8$  parásitos fueron recolectados por centrifugación a 3000 x g, luego fueron lavados con buffer de electroporación y finalmente fueron resuspendidos en 400  $\mu$ l del mismo buffer. Los parásitos fueron colocados en una cubeta de electroporación de 0.2 cm (BioRad) junto con 50  $\mu$ g de ADN, y fueron sometidos a un pulso de 400 V y 500  $\mu$ F, obteniéndose una constante de tiempo de aproximadamente 5 ms. Posteriormente las células se diluyeron en 5 ml de medio BHT y se cultivaron a 28 °C. A las 24 h posteriores a la transfección se adicionó el respectivo agente de selección y a las 48 h se repicó el cultivo con un factor de dilución 1:10 manteniendo la presión de selección. Estos cultivos se monitorearon periódicamente y cuando las células recuperaron la tasa de replicación y la morfología normal se repitieron los repiques. Esto se continuó hasta que finalizó el periodo de selección. Como control de selección se utilizaron epimastigotes transfectados con el mismo vector expresando a la proteína marcadora GFP.

## ***Manipulación y obtención de ADN***

### ***Cuantificación de ADN***

Los ácidos nucleicos fueron diluidos adecuadamente en agua y se determinó la absorbancia de las soluciones en un espectrofotómetro a 260 nm. Las concentraciones en las soluciones madres se calcularon según  $C = (Abs_{260muestra} - Abs_{260blanco})C_0 \times F_d$ , donde  $C_0$ =concentración de ácidos nucleicos en la solución madre;  $Abs_{260muestra}$ = lectura de la absorbancia de la muestra a 260 nm;  $Abs_{260 blanco}$ = lectura de la absorbancia del agua empleada para realizar las diluciones a 260nm,  $C_0$ = concentración de una solución estándar de ácidos nucleicos (este valor se considera de 50  $\mu$ g/ml para ADN doble

cadena, 40 µg/ml para ARN y 33 µg/ml para ADN simple cadena); Fd= factor de dilución de la muestra respecto a la solución madre.

### ***Obtención de ADN genómico de T. cruzi***

Un cultivo de 1-2 ml de epimastigotes en fase exponencial tardía fue centrifugado a 2000 x g durante 5 minutos y lavado con PBS. Los parásitos fueron resuspendidos en 1 ml de buffer de lisis, se les agregó 0.5 ml de PIC y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto y se volvió a repetir la extracción con PIC. Luego se extrajo con 0.5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó el ADN con el agregado de un volumen de isopropanol centrifugando durante 20 minutos a máxima velocidad. El precipitado se lavó con etanol 70% v/v y se resuspendió en 100-200 µl de agua.

### ***Obtención de ADN plasmídico***

El ADN plasmídico fue purificado mediante un protocolo adaptado del método de lisis alcalina (Birnboim & Doly 1979). A partir de 3 ml de cultivo saturado de *Escherichia coli*, se cosecharon las bacterias por centrifugación a 15000 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado bacteriano en 100 µl de solución de resuspensión PI con vigorosa agitación. Se adicionaron 200 µl de solución PII y se homogenizó cuidadosamente, provocando la ruptura celular con la consiguiente liberación y desnaturalización de ADN genómico y plasmídico. Se re-naturalizó el ADN por el agregado de la solución PIII, se homogenizó cuidadosamente y se centrifugó a 16000 x g durante 10 minutos, provocando la precipitación del ADN genómico. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 0.5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se emulsionaron las fases mediante fuerte agitación y se centrifugó a 16000 x g durante 1 minuto. Se recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción orgánica. Finalmente se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 0.5 ml de isopropanol, homogenización y centrifugación por 15 minutos a 16000 x g. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado obtenido con etanol 70% v/v y posterior centrifugación a 16000 x g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN plasmídico se resuspendió en 32 µl de agua. El ADN así purificado fue utilizado en digestiones analíticas y preparativas durante la construcción de los diferentes vectores de este trabajo.

Para preparar ADN de alta pureza para secuenciar se prosiguió con el agregado de 8µl de NaCl 4 M y 40 µl de PEG<sub>8000</sub> 13% estéril. Se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo al menos durante 20 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos a 4 °C. El precipitado se lavó con etanol 70%, v/v se secó y se resuspendió en 20 µl de agua estéril.

## ***Secuenciación de ADN***

Los plásmidos a analizar fueron debidamente amplificados en cultivos de *Escherichia coli*, purificados por precipitación con PEG, cuantificados, diluidos a 200 ng/μl y enviados a MacroGen Inc (Seúl, Corea) donde fueron secuenciados.

## ***Reacciones en cadena de la ADN polimerasa (PCR)***

Las diferentes PCRs con Taq ADN polimerasa (Promega) fueron llevadas a cabo en el buffer provisto por los fabricantes con 10 - 1000 ng de ADN, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs y 10 pmol de cada oligonucleótido en un volumen final de 50 μl. Las amplificaciones se realizaron de acuerdo a los siguientes ciclos: a) Desnaturalización inicial: 5 minutos a 95 °C; b) 30 ciclos. Desnaturalización: 30 segundos a 95 °C; Anidado: 1 minuto a la temperatura (\*) indicada para cada oligonucleótido; Elongación: 1 minuto por cada Kpb a amplificar a 72 °C; c) Elongación final: 10 minutos a 72 °C. Se realizaron controles de amplificación y de contaminación. El equipo de PCR utilizado fue un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). La amplificación se chequeó por electroforesis en agarosa. La temperatura de anidado (\*) utilizada fue la sugerida por el programa Vector NTI Advance® v.10 (Invitrogen) teniendo en cuenta la procesividad de la enzima Taq y la composición de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de ADN.

La amplificación se chequeó por electroforesis en gel de agarosa utilizando un marcador de peso molecular.

## ***Digestión de ADN con enzimas de restricción***

Las enzimas utilizadas fueron de New England Biolabs (NEB) y de Promega. Se utilizaron 5 U de enzima por μg de ADN a digerir incubando en los buffers y temperatura sugeridos por el fabricante durante un mínimo de 3hs.

## ***Preparación de vectores y fragmentos de ADN***

Los vectores utilizados fueron digeridos con las enzimas de restricción indicadas y purificados mediante electroforesis en geles de agarosa. Las bandas correspondientes fueron aisladas y extraídas con el kit de extracción "Gen Elute™ Gel Extraction Kit" (Sigma Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Para la purificación de productos de PCR se utilizaron las mismas columnas comerciales.

## ***Ligación de fragmentos de ADN***

Las ligaciones se realizaron con una relación molar inserto:vector de 3:1 utilizando 50 ng de vector en un volumen final de 20 μl con 100 U de T4 ADN ligasa (NEB). Las incubaciones fueron realizadas a 4 °C durante toda la noche.



Para la ligación de productos de PCR al vector pGEM-T Easy (Promega) se prosiguió de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

### ***Electroforesis de ADN en geles de agarosa***

Los geles de agarosa utilizados se prepararon en buffer TAE 1X al 1-2 % (de acuerdo al tamaño de banda a visualizar) con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 10 V/cm. Antes de la siembra, las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6X. Los geles fueron visualizados en un transiluminador (UVP) y fotografiados.

## ***Técnicas para análisis de proteínas***

### ***Preparación de extractos de epimastigotes***

Para los ensayos de Western Blot los parásitos fueron contados, lavados dos veces con PBS y resuspendidos directamente en buffer de siembra 1X a una densidad de 2-5 x10<sup>8</sup> parásitos/ml.

### ***Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)***

Las muestras diluidas en buffer de siembra 1X se prepararon calentándolas por 5 minutos a 100 °C. Luego se sembraron en geles desnaturalizantes (0,1% SDS, 12-15% acrilamida) y se corrieron en buffer Tris-Glicina-SDS 1X (Laemmli, 1970). Los marcadores de peso molecular utilizados cubrían los rangos de 14,3 a 200 KDa (High range, Rainbow, Low range, BioRad). Se utilizó el equipo miniPROTEAN 3 BioRad. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y luego lavados con solución desteñidora.

### ***Western Blot***

Las muestras a analizar por WB fueron resueltas en geles de acrilamida desnaturalizantes (12-15%) y transferidas a membranas PVDF (Pierce), previamente activadas con metanol, durante 1 hora a 100 V en un equipo de transferencia semi-seca (Trans-Blot SD, BioRad). Se controló la eficiencia de la transferencia tiñendo la membrana con Rojo Ponceau. Las membranas fueron bloqueadas en buffer T-PBS con 5 % de leche en polvo descremada durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación e incubadas con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo por 12 horas a 4 °C. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces con T-PBS e incubadas con el anticuerpo secundario (α-IgG) conjugado con peroxidasa de rabanito (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con

agitación. Las membranas fueron lavadas 3 veces con T-PBS y reveladas con el reactivo para quimioluminiscencia Supersignal™ West Pico (Pierce).

Anticuerpos primarios utilizados:

- $\alpha$ -Flag monoclonal hecho en ratón (F1804, Sigma Aldrich). Dilución 1:4000
- $\alpha$ -AK policlonal hecho en ratón (producido en nuestro laboratorio). Dilución 1:4000

Anticuerpos secundarios utilizados:

- $\alpha$ -ratón HRP hecho en caballo (PI-2000, Vector Labs). Dilución 1:2500

## ***Fijación de parásitos e Inmunofluorescencias Indirectas***

Aproximadamente  $5 \times 10^7$  parásitos fueron recolectados, lavados con PBS y resuspendidos en 500  $\mu$ l del mismo buffer. Se colocaron 200  $\mu$ l de la suspensión en portaobjetos pre-tratados con poli-lisina durante 20 minutos. Los parásitos adheridos al vidrio se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos y se permeabilizaron con metanol a  $-4$  °C por 5 minutos. Para las inmunofluorescencias las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon durante 10 min con BSA al 1% en PBS. Luego, en una cámara húmeda, se incubó durante 45 minutos con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo, se lavó 3 veces con PBS y se incubó durante 30 minutos más con el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo correspondiente en solución de bloqueo. Los parásitos fueron lavados tres veces con PBS y montados con líquido de montaje Vectashield (Vector Labs) conteniendo DAPI. Se observaron los parásitos en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 con una configuración orientada a la microscopía de tripanosomátidos. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital monocromática refrigerada modelo Olympus XM10 con un sensor CCD Sony.

Anticuerpos primarios utilizados:

- $\alpha$ -Flag monoclonal hecho en ratón (F1804, Sigma Aldrich). Dilución 1:200
- $\alpha$ -TCLP1 policlonal hecho en conejo (cedido amablemente por el Dr. Carlos Buscaglia, IIB-INTECH UNSAM, Argentina). Dilución 1:50

Anticuerpos secundarios utilizados:

- $\alpha$ -ratón Alexa Fluor® 488 hecho en cabra (ab150113, Abcam). Dilución 1:500
- $\alpha$ -conejo Alexa Fluor® 594 hecho en cabra (ab150080, Abcam). Dilución 1:500

## ***Citometrías de flujo***

Se recolectaron  $10^7$  parásitos, los cuales fueron lavados con PBS y fijados con 500  $\mu$ l de etanol 70% v/v a 4 °C durante la noche. Luego los parásitos fijados fueron lavados nuevamente con PBS e incubados durante 30 minutos a 37 °C con 500  $\mu$ l de solución de

tinción con ioduro de propidio (2 mM EDTA, 10 mg/ml RNAsaA libre de ADN, y 20 mg/ml Ioduro de Propidio en PBS). Las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo FACS Aria II (BD Biosciences), y los resultados fueron analizados con el software FlowJo. La intensidad de fluorescencia, que es proporcional al contenido de ADN en las poblaciones de parásitos, se graficó contra el conteo celular para cada punto a fin de monitorear la progresión del ciclo de vida. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

## ***Ensayos de transporte***

### ***Transporte de metabolitos en levaduras***

Las células de *S. cerevisiae* de la cepa YOR348c transformadas con el vector p416 vacío o con los genes TcAAP069 o TcAAP733 (p416-TcAAP069 o p416-TcAAP733 respectivamente) fueron cosechadas en la fase exponencial de crecimiento y resuspendidas a una OD final de 1 en 100  $\mu$ l de PBS (1 OD  $\sim$   $1 \times 10^7$  células). La reacción comenzó con el agregado de la solución de transporte conteniendo el aminoácido o la mezcla de aminoácidos marcados radioactivamente a una concentración específica por un período de tiempo determinado. Luego las células fueron lavadas tres veces en PBS y lisadas con la solución PII. Se añadieron 900  $\mu$ l de líquido de centelleo UltimaGold XR (Packard Instrument Co.), y se midió la radioactividad de las células en un equipo contador de centelleo Beckman. La incorporación inespecífica y el arrastre de marca radioactiva fueron medidos con la mezcla de transporte en el t0 (tiempo cero), o al incubar la muestra a 4 °C, o bien utilizando un exceso molar de 100 veces el sustrato a medir sin marca radioactiva. La viabilidad de las levaduras se controló mediante visualización en microscopio. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

Para los ensayos de especificidad de sustrato sólo se utilizaron las levaduras transformadas con el vector p416-TcAAP069. Se incubaron las células con la mezcla de transporte, y además se agregó el sustrato a evaluar en una concentración final de 10 mM, equivalente a una concentración 10 veces mayor que la L-prolina. El resto del ensayo se realizó como se describió anteriormente.

-Mezcla de transporte 2X para prolina: PBS 1X, Prolina 1 mM, L-(<sup>3</sup>H)-Prolina (PerkinElmer's NEN® Radiochemicals; 0,4  $\mu$ Ci).

### ***Transporte de metabolitos en epimastigotes de T. cruzi***

Se contaron las células en una cámara hemocitométrica. Se recolectaron alícuotas de manera tal que contuvieran  $1 \times 10^7$  parásitos y se cosecharon en centrífuga a 2000 x g durante 5 minutos. Las muestras se lavaron con PBS dos veces, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS + Glucosa 2% p/v y se dejaron a 28 °C durante 2 horas. Se incubaron los

parásitos con 100  $\mu$ l de la mezcla de transporte 2X durante el tiempo correspondiente a 28 °C. La reacción se detuvo añadiendo 800  $\mu$ l de PBS frío, las células fueron centrifugadas a 12000 x g durante 1 minuto, y lavadas dos veces con PBS frío. Los pellets fueron resuspendidos en 200  $\mu$ l de agua y se añadió líquido de centelleo (350  $\mu$ l) UltimaGold XR (Packard Instrument Co.). Se midió la radioactividad de las células en un equipo contador de centelleo Beckman. La incorporación inespecífica y el arrastre de marca radioactiva fueron medidos con la mezcla de transporte en el t0 (tiempo cero), o al incubar la muestra a 4 °C, o bien utilizando un exceso molar de 100 veces el sustrato a medir sin marca radioactiva. La viabilidad de los parásitos se controló mediante visualización en microscopio. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

Para los ensayos de determinación de los parámetros cinéticos del transporte de prolina se utilizaron los parásitos Tc069. Se ensayaron las siguientes concentraciones de prolina: 0, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 5 mM. El resto del ensayo se realizó como se describió anteriormente. Para analizar la inhibición producida por la D-prolina, se utilizaron las siguientes concentraciones de prolina: 0, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 4 mM; pero se añadió además el D-aminoácido en cada punto de la curva en una concentración final de 10 mM, equivalente a una concentración 10 veces mayor respecto a la L-prolina.

Para los ensayos de inhibición del transporte de prolina con T4C, hidroxiprolina, D-prolina y alanina se utilizaron los parásitos Tc069. Se incubaron las células con la mezcla de transporte, y además se agregó el sustrato a evaluar en una concentración final de 1 o 10 mM, equivalente a una concentración igual o 10 veces mayor respecto a la L-prolina. El resto del ensayo se realizó como se describió anteriormente.

Para los ensayos de inhibición con los análogos de prolina se utilizaron parásitos TcGFP y Tc069. Se evaluaron los análogos en una concentración final de 40  $\mu$ M para los ensayos preliminares, y para las curvas de dosis-respuesta se utilizaron las siguientes concentraciones: 0, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ M. El resto del ensayo se realizó como se describió anteriormente.

-Mezcla de transporte 2X para prolina: PBS 1X; Prolina 1 mM o 400  $\mu$ M; L-(<sup>3</sup>H)-Prolina (PerkinElmer's NEN® Radiochemicals; 0,4  $\mu$ Ci).

Para los ensayos de especificidad de los análogos se utilizaron parásitos Tc069 y se analizó el transporte de una mezcla de aminoácidos y de timidina con todos los análogos, y de putrescina, lisina y glutamato sólo con los análogos ITP-1B e ITP-1G. La mezcla de aminoácidos contiene: alanina, arginina, aspartato, glutamato, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina.

-Mezcla de transporte 2X para mezcla de aminoácidos: PBS 1X; Aminoácidos 150  $\mu$ M c/u; L-(<sup>3</sup>H)-Aminoácido (PerkinElmer's NEN® Radiochemicals; 0,4  $\mu$ Ci).

-Mezcla de transporte 2X para timidina: PBS 1X; Timidina 100  $\mu$ M; ( $^3$ H)-Timidina (PerkinElmer's NEN<sup>®</sup> Radiochemicals; 0,4  $\mu$ Ci).

-Mezcla de transporte 2X para putrescina: PBS 1X; Putrescina 100  $\mu$ M; L-( $^3$ H)-Putrescina (PerkinElmer's NEN<sup>®</sup> Radiochemicals; 0,4  $\mu$ Ci).

-Mezcla de transporte 2X para lisina: PBS 1X; Lisina 100  $\mu$ M; L-( $^3$ H)-Lisina (PerkinElmer's NEN<sup>®</sup> Radiochemicals; 0,4  $\mu$ Ci).

-Mezcla de transporte 2X para glutamato: PBS 1X; Glutamato 1 mM; L-( $^3$ H)-Glutamato (PerkinElmer's NEN<sup>®</sup> Radiochemicals; 0,4  $\mu$ Ci).

### ***Determinación de Prolina Intracelular***

Se utilizó la reacción colorimétrica de la ninhidrina (Bates 1973). Se recolectaron  $10^7$  parásitos, se lavaron con PBS, se resuspendieron en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7 y luego fueron lisados con ultrasonido. Se centrifugó 10 minutos a 16000 x g, se descartó el precipitado, y el sobrenadante fue tratado con una solución de TCA 5% a 4 °C durante una hora. Nuevamente se centrifugó 10 minutos a 16000 x g y se mezcló el sobrenadante con la solución de ninhidrina ácida y ácido acético glacial durante una hora a 100 °C. La reacción se detuvo colocando los tubos en hielo y agregando tolueno, seguido de agitación vigorosa. Se recuperó la fase orgánica en un nuevo tubo y se midió la absorbancia a 520 nm. La concentración de prolina intracelular se determinó a partir de una curva de calibración.

### ***Determinación de ATP intracelular***

Se utilizó el kit "ATP Bioluminescence Assay Kit HS II" (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recolectaron  $3 \times 10^6$  parásitos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de buffer de dilución y 300  $\mu$ l de buffer de lisis, ambos provistos por el fabricante. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se lisaron mediante un ciclo de congelado y descongelado en nitrógeno líquido. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su medición. La concentración de ATP se midió en un luminómetro (Triathler Multilabel Tester, Hidex) mezclando 25  $\mu$ l de la muestra junto con 25  $\mu$ l del reactivo luciferasa. Se realizó además una curva estándar de ATP.

## ***Tratamientos***

### ***Estrés Oxidativo***

Se recolectaron parásitos en fase exponencial, se los colocó en placas de 24 pocillos, y se los incubó durante 30 minutos con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (0, 0.001, 0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5 y 1 mM). Luego de ese período se agregó medio de cultivo BHT fresco, de modo tal que los parásitos quedaron en una densidad final de  $0.5 \times 10^7$  parásitos/ml. Se monitoreó el crecimiento de los cultivos durante 96 horas a fin de determinar la concentración de peróxido de hidrógeno necesaria para disminuir el crecimiento al 50% ( $IC_{50}$ ). Como control se realizó el mismo procedimiento pero sin agregado de peróxido.

Los ensayos con levaduras se realizaron como se describió anteriormente, excepto que luego de la incubación con peróxido de hidrógeno se agregó medio de cultivo YPD fresco y las concentraciones de peróxido evaluadas fueron las siguientes: 0, 0.1, 0.2, 0.4 y 1 M.

### ***Estrés Nitrosativo***

Se recolectaron parásitos en fase exponencial, se los colocó en placas de 24 pocillos, y se los incubó durante 30 minutos con distintas concentraciones de una sal de dietilamina NONOato (DEA NONOato) que actúa como dador de óxido nítrico (NO). Se calculó la liberación de NO a modo de evaluar las siguientes concentraciones: 0, 0.001, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 y 10 mM. Luego de ese período se agregó medio de cultivo BHT fresco, de modo tal que los parásitos quedaron en una densidad final de  $0.5 \times 10^7$  parásitos/ml. Se monitoreó el crecimiento de los cultivos durante 96 horas a fin de determinar la concentración de óxido nítrico necesaria para disminuir el crecimiento al 50% ( $IC_{50}$ ). Como control se realizó el mismo procedimiento pero en lugar de agregar DEA NONOato, se agregó el mismo volumen de DMSO, que fue el solvente en el que se preparó el dador de óxido nítrico.

### ***Drogas Tripanocidas***

Se recolectaron parásitos en fase exponencial, se los colocó en placas de 24 pocillos en una densidad final de  $0.5 \times 10^7$  parásitos/ml, y se los incubó con distintas concentraciones de nifurtimox o benznidazol. Se utilizaron las siguientes concentraciones respectivamente: 0, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M; 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 y 500  $\mu$ M. Se monitoreó el crecimiento de los cultivos durante 96 horas a fin de determinar la concentración de droga necesaria para disminuir el crecimiento al 50% ( $IC_{50}$ ). Como control se realizó el mismo procedimiento pero en lugar de agregar benznidazol o nifurtimox, se agregó el mismo volumen de DMSO, que fue el solvente en el que se prepararon las drogas.

## ***Análogos de Prolina***

Se recolectaron parásitos en fase exponencial, se los colocó en placas de 24 pocillos en una densidad final de  $0.5 \times 10^7$  parásitos/ml, y se los incubó con distintas concentraciones de cada uno de los análogos (0, 1, 10, 25, 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$  -esta última sólo para el compuesto ITP-1D-). Se monitoreó el crecimiento de los cultivos durante 96 horas a fin de determinar la concentración de cada compuesto necesaria para disminuir el crecimiento al 50% ( $\text{IC}_{50}$ ). Como control se realizó el mismo procedimiento pero en lugar del análogo se agregó el mismo volumen de DMSO, que fue el solvente en el que se prepararon los compuestos.

## ***Obtención de medio de cultivo condicionado***

El medio condicionado se obtuvo a partir de un cultivo de epimastigotes mantenido durante 15 días sin ser repicado. Se analizó mediante observación en el microscopio que no hubiera una cantidad significativa de parásitos lisados. Se centrifugaron 30 ml de dicho cultivo en un tubo estéril a 2000 x g durante 10 minutos, se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo estéril y se centrifugó a 12000 x g durante 20 minutos. Se observó en microscopio el sobrenadante final para corroborar que no hubiera parásitos en el medio de cultivo condicionado.

## ***Análogos de prolina***

ITP-1B: (S)-metil 2-(metil((1-undecil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)propanoato

ITP-1C: (S,Z)-metil 2-(metil((1-(nonadec-10-en-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)propanoato

ITP-1D: (S)-metil 2-(((1-heptadecil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)(metil)amino)propanoato

ITP-1G: (S)-metil 2-metil((1-(3E,7E)-4,8,12-trimetiltrideca-3,7,11-trien-1-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)propanoato

## ***Técnicas bioinformáticas***

Las secuencias de los genes utilizados fueron obtenidas de la base de datos TriTrypDB (<http://tritypdb.org/>).

TcAAAP069: TcCLB.504069.120 (Tc00.1047053504069.120); TcAAAP229: TcCLB.504229.110 (Tc00.1047053504229.110); TcAAAP733: TcCLB.509733.160 (Tc00.1047053509733.160).

El armado de las diferentes construcciones plasmídicas, el análisis de las secuencias de ADN y el diseño de oligonucleótidos fue llevado a cabo mediante el programa Vector NTI Advance® v.10 (Invitrogen).

Los alineamientos locales se realizaron con el programa BLAST disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

El análisis de predicción de los pasos transmembrana de los transportadores se realizó con el programa TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>, Tsirigos et al. 2015) y el diagrama de las proteínas se realizó con el programa RbDe (<http://icb.med.cornell.edu/services/rbde/diagrams>).

La cuantificación de la carga proteica en la electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó por densitometría con el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov>).

## ***Análisis estadísticos***

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc).

## ***Plásmidos utilizados***

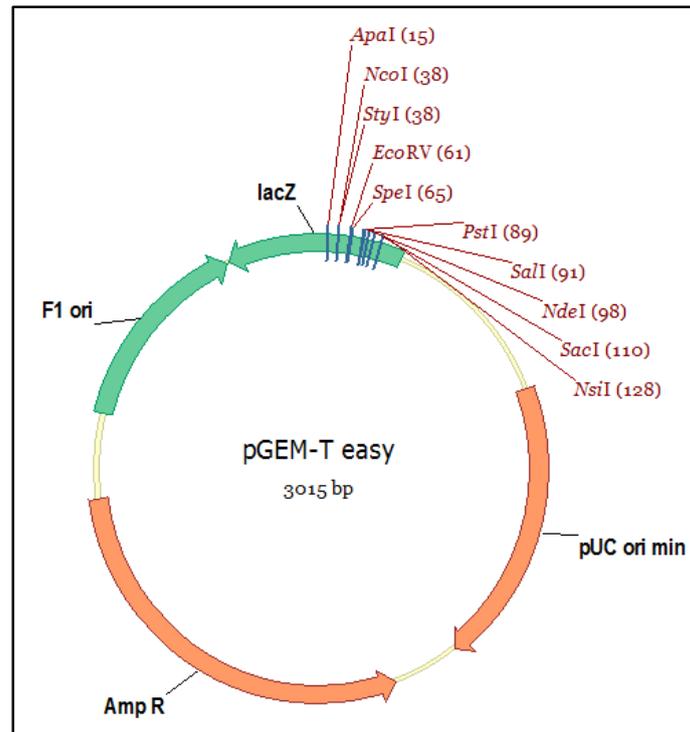
**pGEM-T easy** (Promega). Para el clonado de todos los productos de amplificación por PCR de este trabajo se empleó el vector comercial pGEM-T easy (Figura 15). El plásmido se encuentra previamente linealizado con EcoRV y presenta un nucleótido de desoxitimidina en cada extremo 3'. Por complementariedad de bases, la ligación de los fragmentos de PCR amplificados con Taq ADN polimerasa ocurre con elevada eficiencia.

**pDR196** (Meyer et al. 2006). Plásmido de expresión para levaduras (Figura 16A). Posee el origen de replicación 2 $\mu$  (alto número de copias), el promotor de transcripción de la ATPasa de membrana plasmática (PMA1, promotor constitutivo fuerte) y el gen de la orotidin-5-fosfato decarboxilasa (URA3) para la selección por complementación de auxotrofia de uracilo.

**p416** (Mumberg et al. 1995). Plásmido de expresión para levaduras (Figura 16B). Posee el origen de replicación en levaduras CEN6/ARSH4 (bajo número de copias), el promotor de transcripción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD, promotor fuerte)



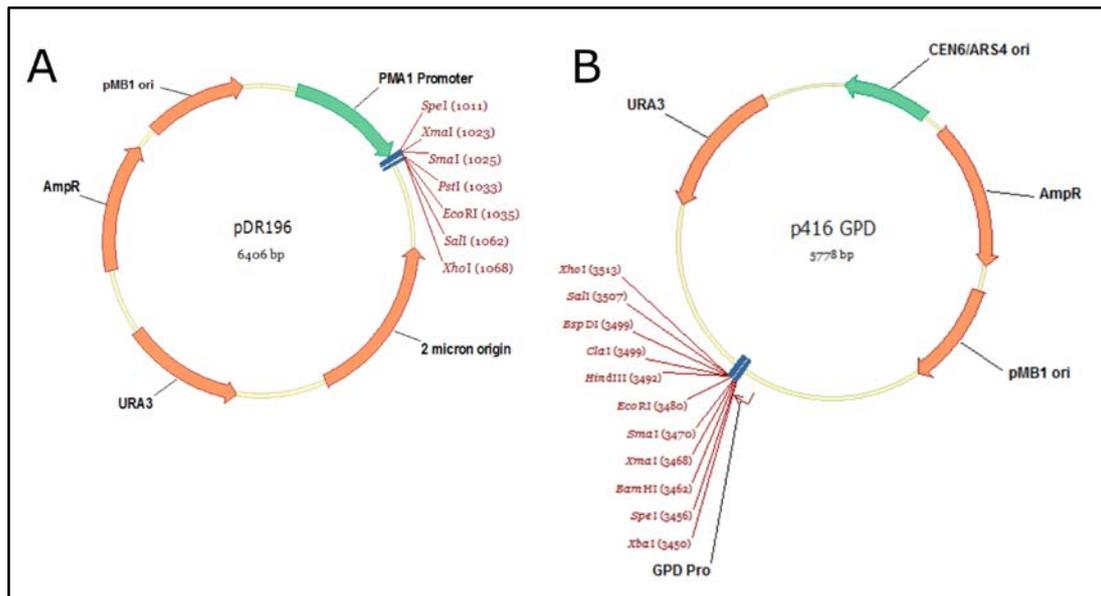
y el gen de la orotidin-5-fosfato decarboxilasa (URA3) para la selección por complementación de auxotrofia de uracilo.



**Figura 15.** Plásmido comercial pGEM-T easy. Se indican la secuencia codificante de la  $\beta$ -lactamasa (AmpR), los orígenes de replicación (F1 ori y pUC ori min), la secuencia codificante para la  $\beta$ -galactosidasa (lacZ) y las enzimas de restricción con corte único del sitio múltiple de clonado. El fabricante linealiza el vector en el sitio EcoRV y agrega una desoxitimidina en cada extremo 3'. Si la ligación con el inserto es exitosa, entonces el gen lacZ queda interrumpido y al añadir X-gal en la placa, este no es degradado y las colonias obtenidas son de color blanco.

**pTEX** (Kelly et al. 1992). Primer plásmido de expresión obtenido para *T. cruzi* (Figura 17A). Este vector se mantiene mayoritariamente como un elemento de replicación extra cromosómico, que puede aumentar considerablemente su tamaño formando concatémeros. Esto se puede exacerbar incrementando la concentración de antibiótico y por lo tanto los niveles de expresión del gen de interés también se verán aumentados. La maduración a mensajeros de los transcritos primarios ocurre gracias a las secuencias intergénicas de los genes GAPDH.

**pTRES** (Vazquez & Levin 1999). Plásmido de expresión para *T. cruzi* derivado del pTEX por incorporación del promotor ribosomal (pRIBOTEX) y la secuencia de procesamiento denominada HX1 del locus de los genes TcP2 $\beta$  (Figura 17B). Este plásmido se integra en el locus ribosomal y la transcripción ocurre por la ARN pol I desde su promotor. La presencia de la secuencia HX1 aumenta considerablemente los niveles de procesamiento y por lo tanto de expresión del gen de interés.



**Figura 16.** Vectores de expresión para levaduras utilizados. A) pDR196. B) p416 GPD. Se indican la secuencia codificante de la  $\beta$ -lactamasa (AmpR), el origen de replicación en bacterias (pMB1 ori), los orígenes de replicación en levaduras (2 micron ori en pDR196, CEN6/ARS4 ori en p416 GPD), los promotores para levadura (PMA1 en pDR196 y GPD en p416 GPD), el gen para selección por complementación de auxotrofia (URA3) y las enzimas de restricción con corte único del sitio múltiple de clonado.

**pTREXL** (Bouvier et al. 2013). Plásmido de expresión para *T. cruzi* derivado del pTREX provisto con múltiples epítopes de reconocimiento por anticuerpos comerciales (Figura 17C). También se encuentran disponibles dos versiones de este plásmido con proteínas reporteras que permiten la fusión de la proteína de estudio a GFP (proteína verde fluorescente) o mCherry (proteína roja fluorescente).

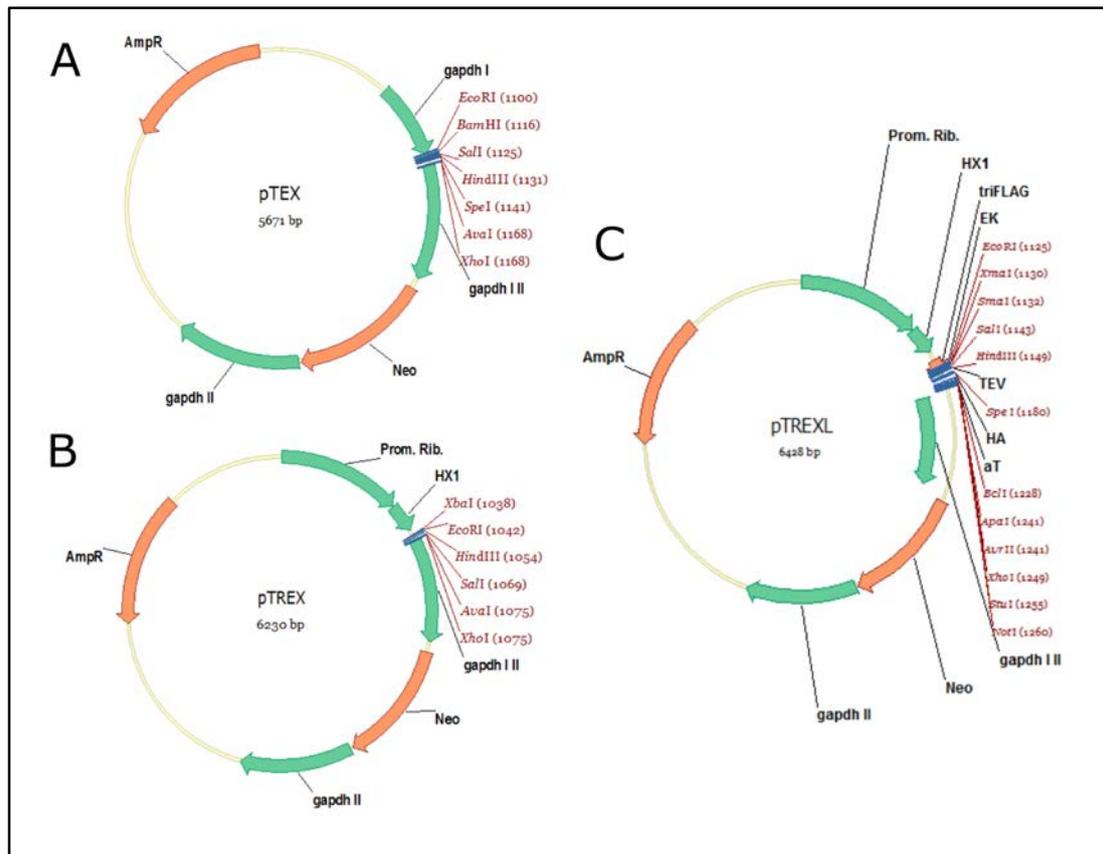
### **Construcciones genéticas**

#### **pDR196-TcAAAP069 y pDR196 de otros miembros de la familia TcAAAP.**

Los vectores se encontraban disponibles en nuestro laboratorio, ya que formaron parte de los experimentos de la tesis del Dr. Gaspar Cánepa. Se utilizaron los siguientes miembros de la familia TcAAAP:

- Tc00.1047053504069.120 (pDR196-TcAAAP069)
- Tc00.1047053510187.540 (pDR196-TcAAAP187)
- Tc00.1047053510245.10 (pDR196-TcAAAP245)
- Tc00.1047053511411.30 (pDR196-TcAAAP411)
- Tc00.1047053510431.30 (pDR196-TcAAAP431)
- Tc00.1047053510507.40 (pDR196-TcAAAP507)
- Tc00.1047053511545.80 (pDR196-TcAAAP545)
- Tc00.1047053511649.100 (pDR196-TcAAAP649)
- Tc00.1047053507659.20 (pDR196-TcAAAP659)
- Tc00.1047053508707.10 (pDR196-TcAAAP707)

-Tc00.1047053503837.20 (pDR196-TcAAAP837)



**Figura 17.** Vectores de expresión para *Trypanosoma cruzi* utilizados. A) pTEX. B) pTREX. C) pTREXL.

Se indican la secuencia codificante de la β-lactamasa (AmpR), el promotor ribosomal (Prom. Rib.), la secuencia HX1 derivada del locus de los genes TcP2β (HX1), la secuencia intergénica relativa a los genes GAPDH I y II (*gapdh I-II*), la que se encuentra río abajo del gen GAPDH II (*gapdh II*), el gen cuya proteína confiere resistencia a G418 (Neo) y las enzimas de restricción con corte único del sitio múltiple de clonado. El vector pTREXL incorpora además los epitopes HA, 3xFlag (TriFlag), y α-Tubulina (aT) y los sitios de clivado para la enteroquinasa EK y para la proteasa TEV.

**pGEM-Teasy-TcAAAP069.** Se amplificó el gen TcAAAP069 (Tc00.1047053504069.120) a partir de ADN genómico de *T. cruzi*, fue clonado en el plásmido pGEM-T easy y luego secuenciado para verificar la correcta amplificación. Esta construcción se utilizó como paso intermediario para la generación de otros plásmidos. La amplificación se realizó con los siguientes oligonucleótidos:

-Tc069F: ATGTCTCATCCAAATGAACC

-Tc069R: CTCGAGTCACTCCACTAAAC

**pGEM-Teasy-(Spe)TcAAAP069.** Se amplificó el gen TcAAAP069 (Tc00.1047053504069.120) a partir de ADN genómico de *T. cruzi*, fue clonado en el plásmido pGEM-T easy y luego secuenciado para verificar la correcta amplificación. Esta construcción se utilizó como paso intermediario para la generación de otros plásmidos. La amplificación se realizó con los siguientes oligonucleótidos:

-Tc069F-Spe: ACTAGTATGTCTCATCCAAATGAACC (sitio SpeI)

-Tc069R: CTCGAGTCACTCCACTAAAC

**pGEM-Teasy-TcAAAP733.** Se amplificó el gen TcAAAP733 (Tc00.1047053509733.160) a partir de ADN genómico de *T. cruzi*, fue clonado en el plásmido pGEM-T easy y luego secuenciado para verificar la correcta amplificación. Esta construcción se utilizó como paso intermediario para la generación del plásmido p416-TcAAAP733. La amplificación se realizó con los siguientes oligonucleótidos:

-Tc733F: ACTAGTATGGCTTCTCGCGAGGAAAA (sitio SpeI)

-Tc733R: GGATCCGCCAAAGACGGAGTCAAACG (sitio BamHI)

**p416-TcAAAP069.** Se generó el plásmido p416-TcAAAP069 a partir de la ligación de los productos de digestión de las construcciones pGEM-T easy-(Spe)TcAAAP069 (inserto) y p416 GPD (vector). Las enzimas de restricción utilizadas fueron SpeI y XhoI. La correcta ligación fue verificada por dos digestiones diferentes con enzimas de restricción.

**p416-TcAAAP733.** Se generó el plásmido p416-TcAAAP069 a partir de la ligación de los productos de digestión de las construcciones pGEM-T easy-TcAAAP733 (inserto) y p416 GPD (vector). Las enzimas de restricción utilizadas fueron BamHI y XhoI. La correcta ligación fue verificada por dos digestiones diferentes con enzimas de restricción.

**pTREX-TcAAAP069.** Se generó el plásmido pTREX-TcAAAP069 a partir de la ligación de los productos de digestión de las construcciones pGEM-T easy-TcAAAP069 (inserto) y pTREXL (vector). Las enzimas de restricción utilizadas fueron EcoRI y XhoI. La correcta ligación fue verificada por dos digestiones diferentes con enzimas de restricción. Al utilizar estas enzimas el gen TcAAAP069 quedó fusionado al *tag* 3xFlag en su extremo N-terminal.

**pTREX-GFP::TcAAAP069.** Se generó el plásmido pTREX-GFP::TcAAAP069 a partir de la ligación de los productos de digestión de las construcciones pGEM-T easy-(Spe)TcAAAP069 (inserto) y pTREXL-GFP (vector). Las enzimas de restricción utilizadas fueron SpeI y XhoI. La correcta ligación fue verificada por dos digestiones diferentes con enzimas de restricción. Al utilizar estas enzimas el gen TcAAAP069 quedó fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) en su extremo N-terminal.

**pTREX-mCherry::TcAAAP069.** Se generó el plásmido pTREX-mCherry::TcAAAP069 a partir de la ligación de los productos de digestión de las construcciones pGEM-T easy-(Spe)TcAAAP069 (inserto) y pTREXL-mCherry (vector). Las enzimas de restricción utilizadas fueron SpeI y XhoI. La correcta ligación fue verificada por dos digestiones diferentes con enzimas de restricción. Al utilizar estas enzimas el

gen TcAAAP069 quedó fusionado a la proteína roja fluorescente (mCherry) en su extremo N-terminal.

**pTREX-mCherry::TcAAAP411.** Este plásmido se encontraba disponible en nuestro laboratorio ya que fue utilizado para los experimentos de mi tesis de licenciatura, cuyos resultados se encuentran publicados (Miranda et al. 2012). El gen correspondiente al TcAAAP411 es el Tc00.1047053511411.30.

**pTEX-mCherry::AQP.** Este plásmido se encontraba disponible en nuestro laboratorio ya que fue utilizado en mi tesis de licenciatura, cuyos resultados se encuentran publicados (Miranda et al. 2012). El gen correspondiente a la acuaporina 2 (TcAQP) es el Tc00.1047053508257.140.

**pTEX-TcBilbo::GFP.** Este plásmido se encontraba disponible en nuestro laboratorio ya que fue utilizado en mi tesis de licenciatura, cuyos resultados se encuentran publicados (Miranda et al. 2012). El gen correspondiente a la proteína del collar del bolsillo flagelar bilbo1 (TcBilbo) es el Tc00.1047053511127.20.

# Resultados

---

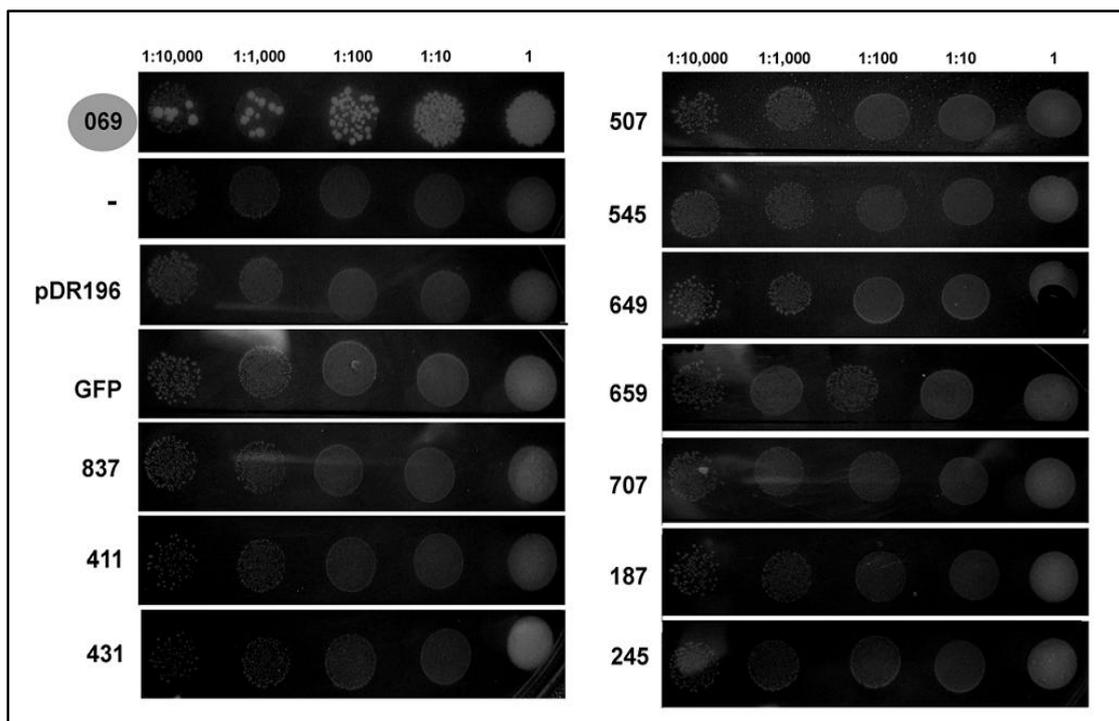
# Capítulo 1. Identificación del transportador de prolina y su caracterización bioquímica

## *1.1 Complementación en levaduras*

Para la identificación de un posible miembro de la familia TcAAAP capaz de transportar prolina se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* MG266 (gentilmente cedida por la Dra. Susana Correa, FCEN-UBA, Argentina). Dicha cepa posee una delección en la permeasa general de aminoácidos (GAP1), de manera que tiene bajos niveles basales en el transporte de los mismos. Además, posee otra delección en la permeasa específica para el transporte de prolina (PUT4), por lo cual el transporte de prolina en esta cepa es despreciable. Entonces, bajo el fundamento de que *S. cerevisiae* utiliza los aminoácidos del medio de cultivo como fuente de nitrógeno para su supervivencia, si se cultiva a esta cepa en un medio definido con prolina como única fuente de nitrógeno, su crecimiento se verá desfavorecido a menos que se complemente esta incapacidad con un transportador que sea capaz de transportar prolina. Cabe destacar que el plásmido utilizado no posee marcadores de selección, por lo que la supervivencia de las levaduras transformadas dependerá exclusivamente por la presencia de un gen que permita incorporar la prolina.

Se transformó esta cepa de levaduras con el plásmido pDR196 conteniendo las secuencias codificantes de once genes representativos de diferentes grupos de la familia TcAAAP previamente caracterizada en nuestro laboratorio (Bouvier et al. 2004). Las levaduras transformadas fueron cultivadas en medio completo YPD y en un medio mínimo donde la única fuente de nitrógeno era prolina (MM +Pro) (Figura 18).

Del resultado de dicha transformación, se observó que el gen TcAAAP069 fue el único capaz de complementar la deficiencia en el transporte de prolina de la cepa *S. cerevisiae* MG266.



**Figura 18.** Búsqueda del transportador de prolina por complementación de levaduras. Sólo se muestran las placas de medio mínimo MM +Pro. Se utilizaron 11 genes de la familia TcAAAP (ver Materiales y Métodos) clonados en el plásmido de expresión pDR196. Como controles se utilizaron levaduras sin transformar (-), levaduras transformadas con el plásmido vacío (pDR196) y por último, levaduras transformadas con la proteína verde fluorescente clonada en el vector pDR196 (GFP).

Una vez identificado el gen TcAAAP069 como posible transportador de prolina, se transformó la cepa YOR348c de *S. cerevisiae* con el vector de expresión p416 vacío (control) y el vector p416-TcAAAP069. La cepa YOR348c no expresa el transportador específico de prolina (PUT4), y además es auxótrofa para uracilo y para los aminoácidos leucina, histidina y metionina. Esta cepa de *S. cerevisiae* sí posee el gen GAP1 que codifica la permeasa general de aminoácidos, así que se espera observar transporte de prolina en ambos cultivos de levaduras. En este caso se utilizó la auxotrofia para uracilo como marcador de selección, dado que el plásmido p416 posee el gen URA3 y por lo tanto las levaduras transformadas con dicho vector podrán crecer en un medio selectivo sin uracilo (medio mínimo MM), transporten o no prolina, a diferencia de la complementación con la cepa MG266 donde la selección dependió exclusivamente del transporte de prolina para su utilización como fuente de nitrógeno. Se evaluó el transporte de prolina de las levaduras control y las levaduras transformadas con el plásmido p416-TcAAAP069 y se calcularon los parámetros cinéticos del transporte obtenido (Figura 19). La tasa de incorporación de prolina obtenida fue casi constante durante 30 minutos, y la velocidad calculada para el transporte en las levaduras transformadas con el gen TcAAAP069 fue 85.9 pmol pro/min ( $\pm 4.7$ ), mientras que para el control se observó un transporte de apenas 1.7 pmol pro/min ( $\pm 0.4$ ). La constante de



Michaelis-Menten aparente estimada (Km) para el transporte de prolina en las levaduras Tc069 fue 11.64 mM ( $\pm$  4.08).

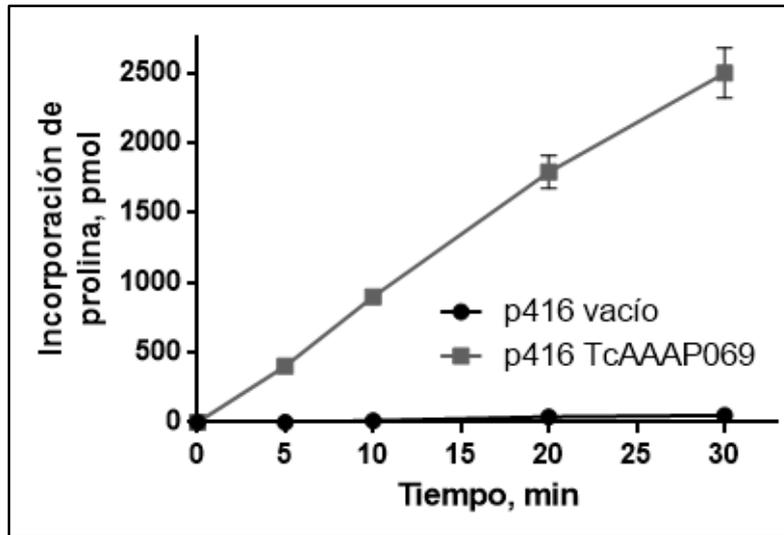


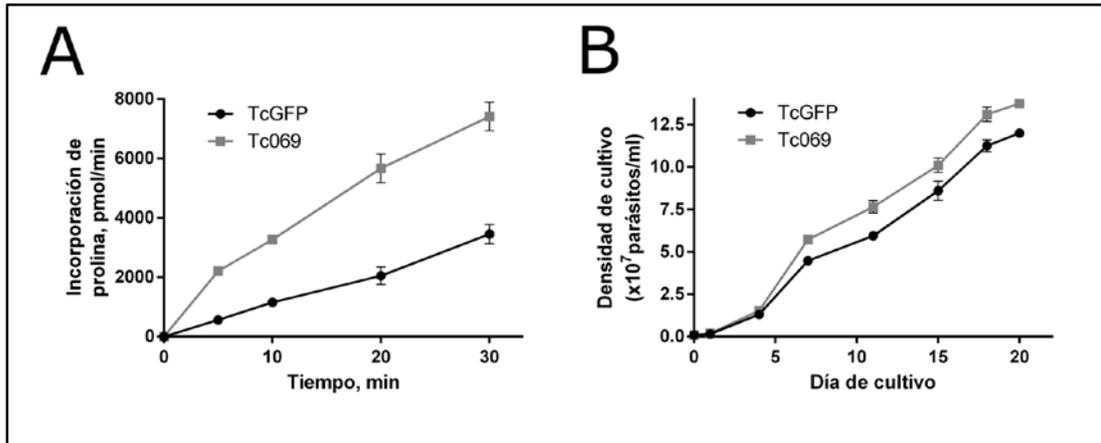
Figura 19. Transporte de prolina en levaduras YOR348c transformadas con los vectores p416-vacío (control) y p416-TcAAAP069.

## 1.2 Generación del modelo de parásitos transgénicos

A continuación se estudió el gen TcAAAP069 en parásitos de *T. cruzi*, mediante la generación de un modelo transgénico de sobre-expresión. Se electroporaron epimastigotes de la cepa MJL y de la cepa Y, DTUs TcI y TcII respectivamente, con los plásmidos pTREX-TcAAAP069 (parásitos Tc069) y pTREX-GFP (parásitos TcGFP) como control. Ambos cultivos fueron seleccionados con el antibiótico G418.

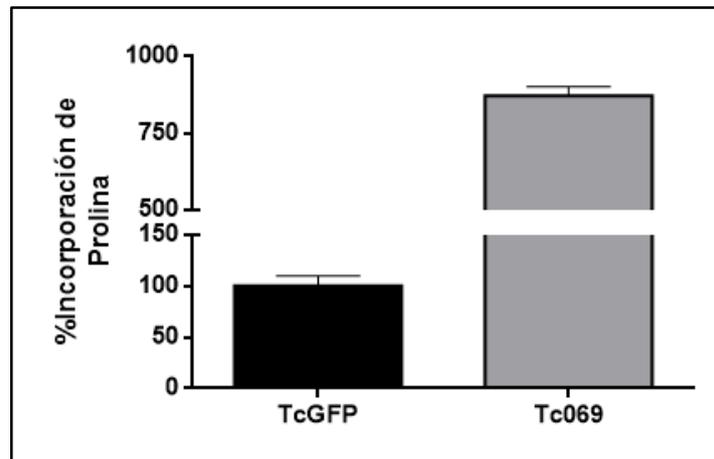
Se chequeó la expresión del gen TcAAAP069 mediante Western Blot con un anticuerpo comercial  $\alpha$ -Flag. En el caso del control, la selección se verificó a través de microscopía de fluorescencia. Una vez verificada la expresión de la permeasa TcAAAP069 se procedió a evaluar el transporte de prolina.

Para la cepa MJL, los parásitos Tc069 mostraron una tasa promedio de incorporación de prolina de 417 pmol pro/min ( $\pm$ 22), mientras que para los parásitos control fue de 73 pmol pro/min ( $\pm$ 11) (Figura 19A). Además los parásitos que sobre-expresan el gen TcAAAP069 presentaron un 30% más de densidad celular durante la curva de crecimiento que los parásitos control (Figura 19B).



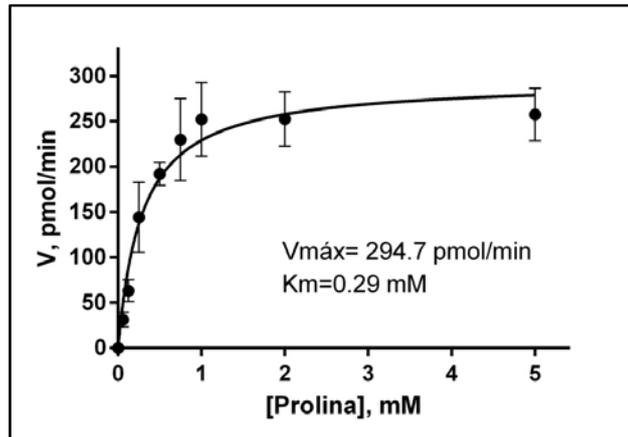
**Figura 19.** Parásitos transgénicos TcGFP y Tc069 de la cepa MJL. A) Transporte de prolina en parásitos que sobre-expresan el transportador de prolina (parásitos Tc069) o la proteína verde fluorescente (parásitos TcGFP). B) Crecimiento de los parásitos Tc069 y TcGFP.

Del mismo modo que para la cepa MJL, la expresión del transportador de prolina en los parásitos Tc069 de la cepa Y se verificó por Western Blot y la selección de los parásitos control se evaluó mediante microscopía de fluorescencia. Además se obtuvo una tasa de incorporación de prolina  $8.7 (\pm 0.3)$  veces mayor para los parásitos Tc069 respecto al control (Figura 20).



**Figura 20.** Transporte de prolina en epimastigotes transgénicos de la cepa Y que sobre-expresan la proteína verde fluorescente (TcGFP) o la permeasa de prolina (Tc069).

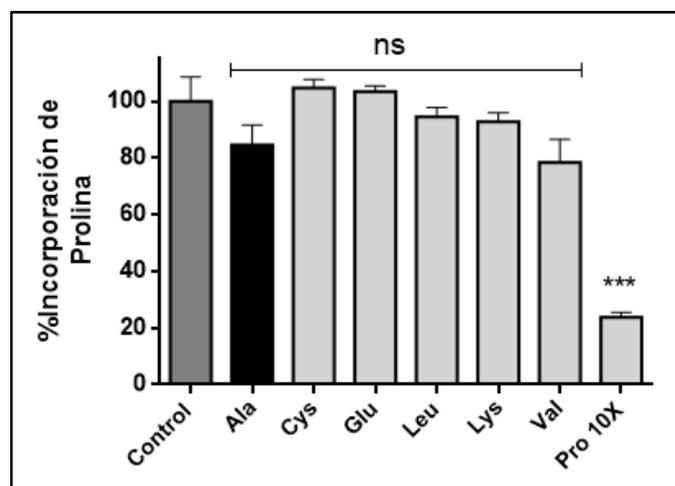
Se realizaron ensayos cinéticos del transporte de prolina en parásitos Tc069 de la cepa Y (Figura 21). Se eligió el siguiente rango de concentraciones: 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 5 mM. Se analizó la incorporación de prolina en un período de 15 minutos. Los resultados mostraron que el transportador de prolina TcAAP069 posee una cinética michaeliana, con una  $V_{m\acute{a}x}=294.7$  pmol pro/min ( $\pm 15.22$ ) y una  $K_{m\text{aparente}}=0.29$  mM ( $\pm 0.05$ ).



**Figura 21.** Cinética del transportador de prolina TcAAAP069 en parásitos que sobre-expresan dicha permeasa en la cepa Y.

### 1.3 Especificidad del transportador de prolina Tc069

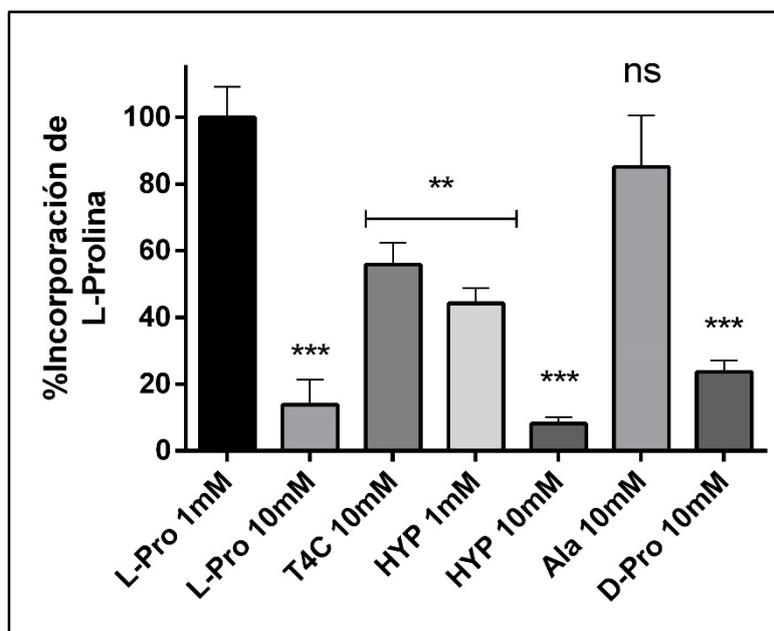
Primero se analizó la especificidad del transportador en el modelo de levaduras. Para ello, se realizaron ensayos de transporte de prolina en presencia de diferentes aminoácidos con estructuras disímiles en una concentración 10 veces mayor respecto a la prolina (Figura 22). Ninguno de los aminoácidos evaluados produjo una inhibición significativa en la incorporación de prolina. Como control positivo se realizó una dilución isotópica utilizando una concentración 10 veces mayor de prolina.



**Figura 22.** Ensayos de inhibición de la incorporación de prolina en levaduras. Se evaluaron los aminoácidos alanina, cisteína, glutamato, leucina, lisina y valina. La actividad observada sin ningún aminoácido como inhibidor fue considerada el 100% de incorporación de prolina. Se realizó una dilución isotópica con prolina en la misma concentración que los inhibidores como control (Pro 10X).

Se remarcó el resultado del ensayo con alanina como posible aminoácido competidor dado que el gen ortólogo al TcAAAP069 en *Leishmania donovani*, el gen LdAAAP24 codifica un transportador bi-específico de prolina/alanina (Inbar et al. 2013). En levaduras que sobre-expresan el transportador de prolina de *T. cruzi* no se observó inhibición en la incorporación de prolina en presencia de un exceso de alanina.

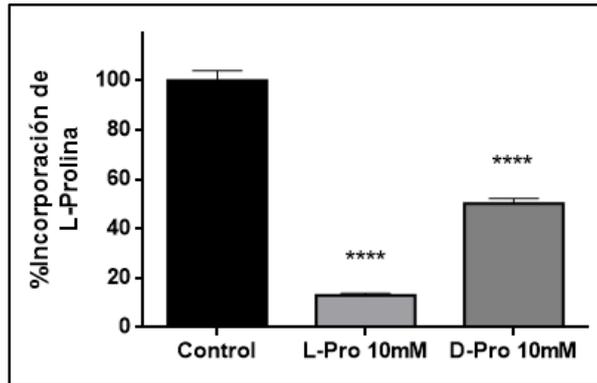
A continuación se evaluó la especificidad del transportador TcAAAP069 en el modelo de parásitos transgénicos. Se ensayaron como inhibidores del transporte de prolina los siguientes compuestos: un inhibidor de transporte y metabolismo de prolina, el ácido L-tiazolidin-4-carboxílico (T4C), un análogo de prolina, la hidroxiprolina (HYP) y nuevamente el aminoácido alanina (Figura 23). Dado que existen algunos casos de transportadores estereo-inespecíficos, aunque particularmente en tripanosomátidos esto no se ha comprobado, además se ensayó la incorporación de L-prolina en presencia de D-prolina (Figura 23).



**Figura 23.** Ensayos de inhibición del transporte de L-prolina en parásitos transgénicos que sobre-expresan la permeasa TcAAAP069. La actividad observada sin ningún inhibidor fue considerada el 100% de incorporación de prolina. Se realizó una dilución isotópica con prolina en la misma concentración que los inhibidores como control (L-Pro 10 mM). HYP: hidroxiprolina; T4C: ácido L-tiazolidin-4-carboxílico; Ala: alanina; D-Pro: D-prolina.

Tanto el T4C como el HYP produjeron una disminución significativa en el transporte de prolina. En el caso del T4C 10 mM y el HYP 1 mM los porcentajes de inhibición fueron similares, siendo del 44.21% ( $\pm 6.6$ ) y 55.74% ( $\pm 4.5$ ) respectivamente. El compuesto HYP en una concentración 10 veces mayor que la prolina abolió casi completamente el transporte de prolina ya que presentó un 91.7% ( $\pm 1.9$ ) de inhibición en la incorporación de dicho aminoácido. Al igual que en levaduras, no se observó una disminución significativa del transporte de prolina en presencia de un exceso de alanina (10 mM).

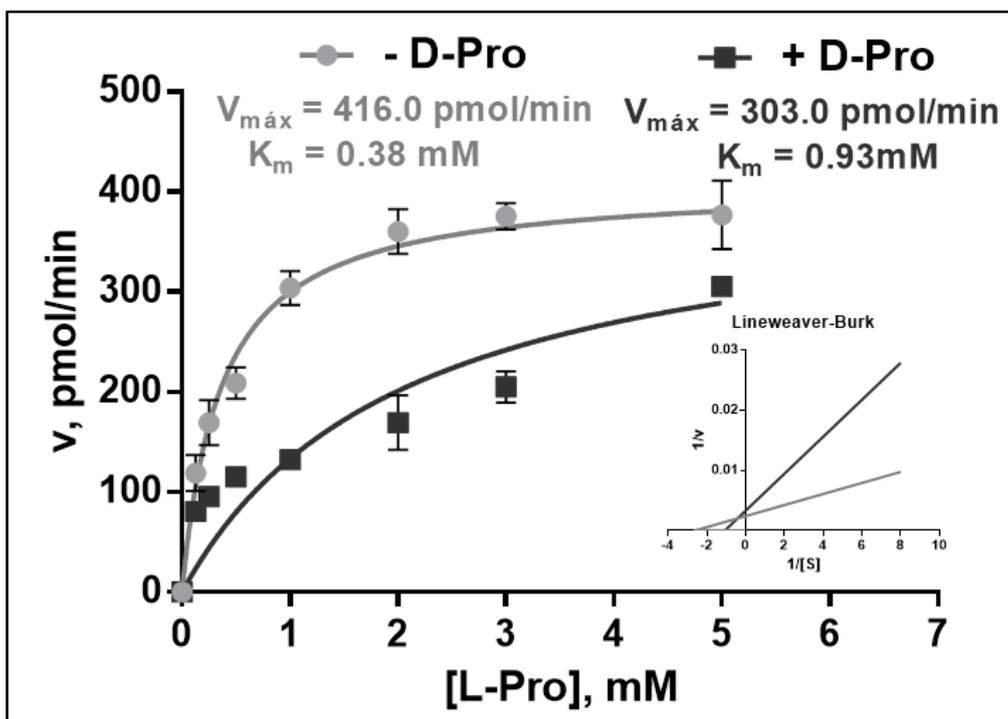
Interesantemente, la D-prolina produjo un 76.3% ( $\pm 3.3$ ) de inhibición en la incorporación de L-prolina respecto al control. Se realizó un ensayo de transporte con los parásitos TcGFP utilizando D-prolina como inhibidor del transporte de L-prolina, y también se observó una disminución significativa de 49.1% ( $\pm 2.1$ ) en la incorporación de dicho aminoácido (Figura 24).



**Figura 24.** Ensayos de inhibición del transporte de L-prolina en parásitos TcGFP en presencia de D-prolina. Se realizó una dilución isotópica con L-prolina en la misma concentración que la D-Prolina como control (L-Pro 10 mM). D-Pro: D-prolina

A fin de profundizar un poco en esta peculiar característica, se realizaron estudios cinéticos del transporte de L-prolina en presencia de D-prolina 10 mM con los parásitos Tc069 para evaluar qué tipo de inhibición ejerce el D-isómero sobre la actividad del transportador TcAAAP069 (Figura 25).

Se observó un aumento en la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), cuyo valor se incrementó de 0.38 mM ( $\pm 0.05$ ) a 0.93 mM ( $\pm 0.48$ ) en presencia de D-prolina. La velocidad máxima no varió significativamente ( $p=0.1745$ ), y se mantuvo entre 416.0 y 303.0 pmol Pro/min. Los datos obtenidos sugieren que la D-prolina ejerce una inhibición competitiva en el transporte de L-prolina mediado por la permeasa TcAAAP069. El rol



**Figura 25.** Cinética de la incorporación de L-Prolina en ausencia y presencia de D-prolina 10 mM. Se muestra además la representación lineal de Lineweaver-Burk de la ecuación de Michaelis-Menten (recuadro interno).

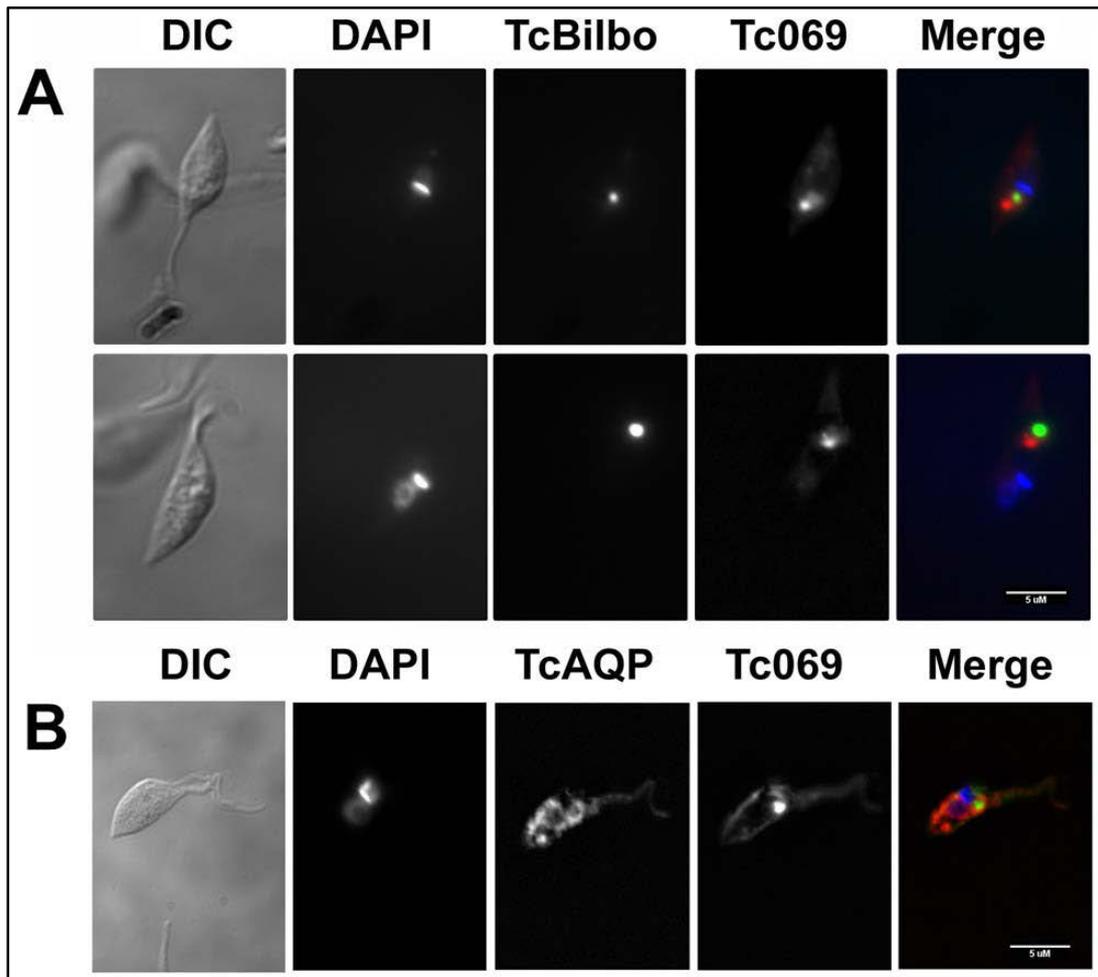
de la D-prolina podría estar asociado a la presencia de prolina racemasas en el parásito pero esto debe ser estudiado con mayor profundidad.

#### **1.4 Localización subcelular**

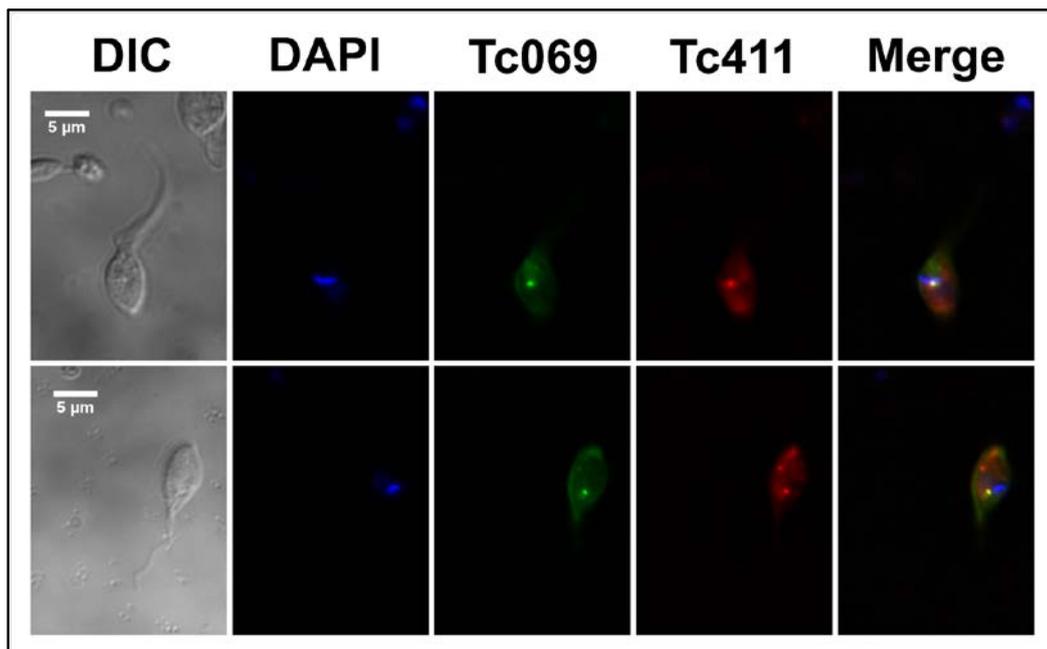
Trabajos previos de nuestro grupo y otros investigadores han indicado que otros transportadores de *T. cruzi* pertenecientes a la familia TcAAAP, como las permeasas de lisina y arginina y también el transportador de poliaminas, se encuentran en una región cercana al bolsillo flagelar (Hasne et al. 2010; Inbar et al. 2012; Miranda et al. 2012). Para evaluar la localización subcelular del transportador TcAAAP069 se construyeron plásmidos con la permeasa fusionada a la proteína verde fluorescente (pTREX-GFP::TcAAAP069) o a una proteína roja fluorescente (pTREX-mCherry::TcAAAP069). Las fusiones se realizaron en el extremo N-terminal de la permeasa debido a reportes previos de nuestro laboratorio en los que se observó que la fusión C-terminal era menos estable. Se utilizó la proteína marcadora del collar del bolsillo flagelar, TcBilbo, fusionada a la proteína GFP (pTEX-TcBilbo::GFP) a fin de demarcar los límites del bolsillo flagelar (Figura 26A) (Bonhivers et al. 2008; Miranda et al. 2012). Luego de transfectar los parásitos, la fluorescencia correspondiente al TcAAAP069 se localizó principalmente en un foco cercano al bolsillo flagelar pero sin co-localizar con TcBilbo.

Dado que el bolsillo flagelar se encuentra asociado al complejo de la vacuola contráctil se ensayó además una proteína marcadora de esta organela y acidocalcisomas, la acuaporina TcAQP fusionada a mCherry (pTEX-mCherry::TcAQP) (Figura 26B). Tampoco se observó co-localización de la permeasa de prolina TcAAAP069 con la acuaporina TcAQP.

Por último se estudió la localización de la permeasa de prolina junto con el transportador de arginina (pTREX-mCherry::TcAAAP411) a fin de observar si se encuentran en la misma región subcelular (Figura 27). Efectivamente se vio que ambas permeasas co-localizan en una región cercana al bolsillo flagelar.



**Figura 26.** Localización subcelular del transportador de prolina TcAAAP069 en epimastigotes de la cepa MJL. A) Co-transfección con TcAAAP069 (rojo) y TcBilbo (verde). B) Co-transfección con TcAQP (rojo) y TcAAAP069 (verde). En color azul se muestra el DAPI. La barra blanca corresponde a 5 µm.



**Figura 27.** Co-localización del transportador TcAAAP069 con el transportador TcAAAP411 en epimastigotes de la cepa MJL. TcAAAP069 (verde), TcAAAP411 (rojo) y DAPI (azul). La barra blanca corresponde a 5 µm.

El hecho de que el transportador Tc069 haya sido localizado en la misma región celular que las permeasas de lisina, arginina y poliaminas, sugiere que probablemente todos los miembros de la familia TcAAP podrían estar concentrados en el bolsillo flagelar, una región única de intercambio con el medio extracelular.

### ***1.5 Evaluación de otros posibles transportadores de prolina***

Los 36 posibles miembros de la familia TcAAP han sido esquematizados en un fenograma construido en base a su identidad aminoacídica (Figura 14, página 45). En la misma rama que el gen TcAAP069 se encuentran 2 genes adicionales: TcAAP229 y TcAAP733. El primero corresponde probablemente a un haplotipo de la cepa CL Brener del TcAAP069, dado que poseen un 99% de consenso en su composición de aminoácidos (exceptuando 62 aminoácidos del extremo N-terminal de la permeasa TcAAP229) (Figura 28). En cuanto al transportador TcAAP733, se observó que a pesar de presentar sólo un 42% de consenso en su secuencia con el transportador de prolina Tc069, ambas proteínas poseen estructuras similares (Figura 29), por lo que podría tratarse de una segunda permeasa de prolina. Silber et al. 2002 demostró que *T. cruzi* presenta dos sistemas de transporte de prolina, uno de baja y otro de alta afinidad (Silber et al. 2002); de este modo, el gen TcAAP069 podría formar parte de un sistema y el gen TcAAP733 pertenecer al otro.

A continuación se estudió si el gen TcAAP733 codifica para un transportador de prolina. Para ello, se transformaron las levaduras de la cepa YOR348c, deficientes en el transporte de prolina, con el vector p416-TcAAP733 y el vector p416 vacío como control y se evaluó la incorporación de prolina.



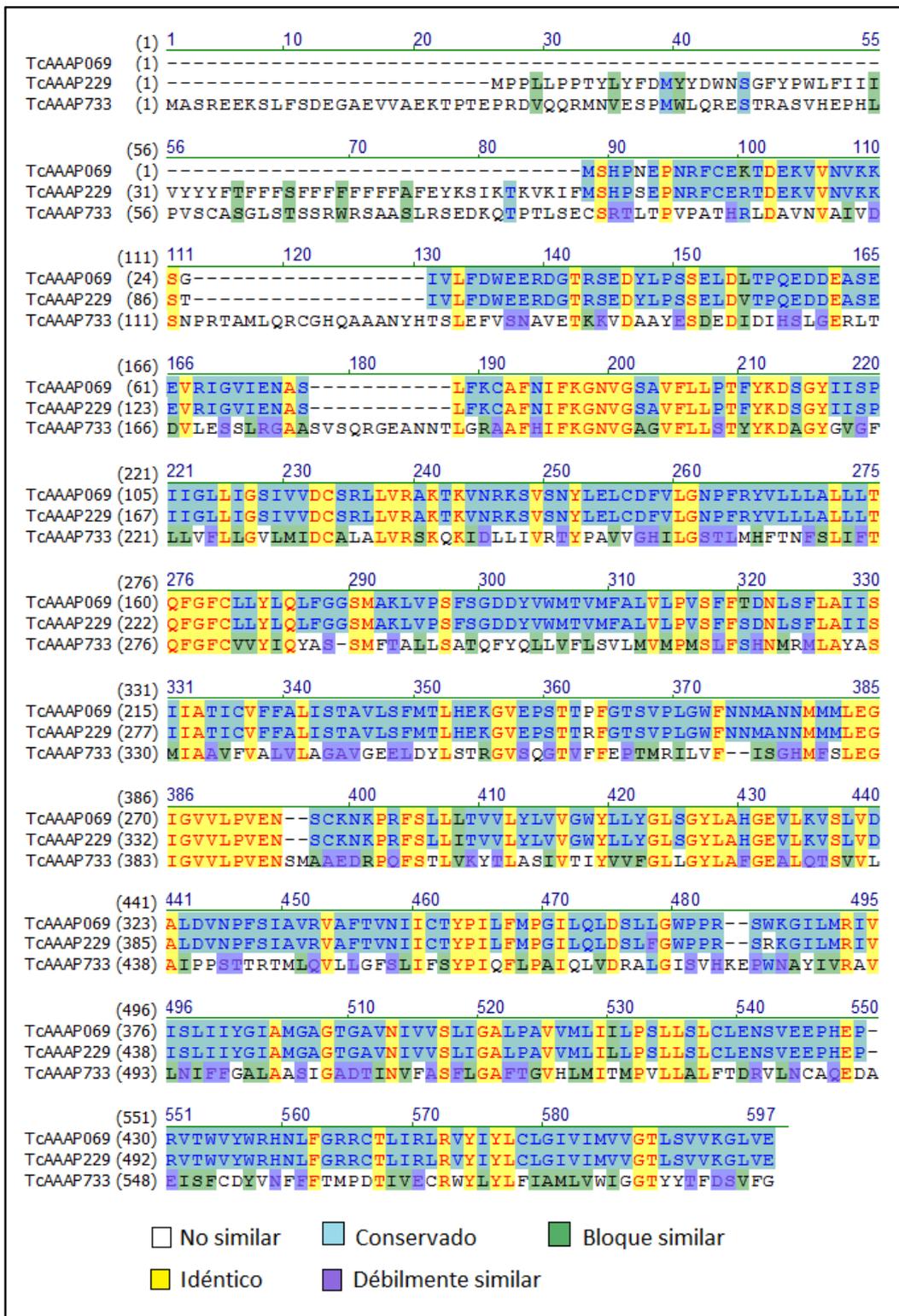
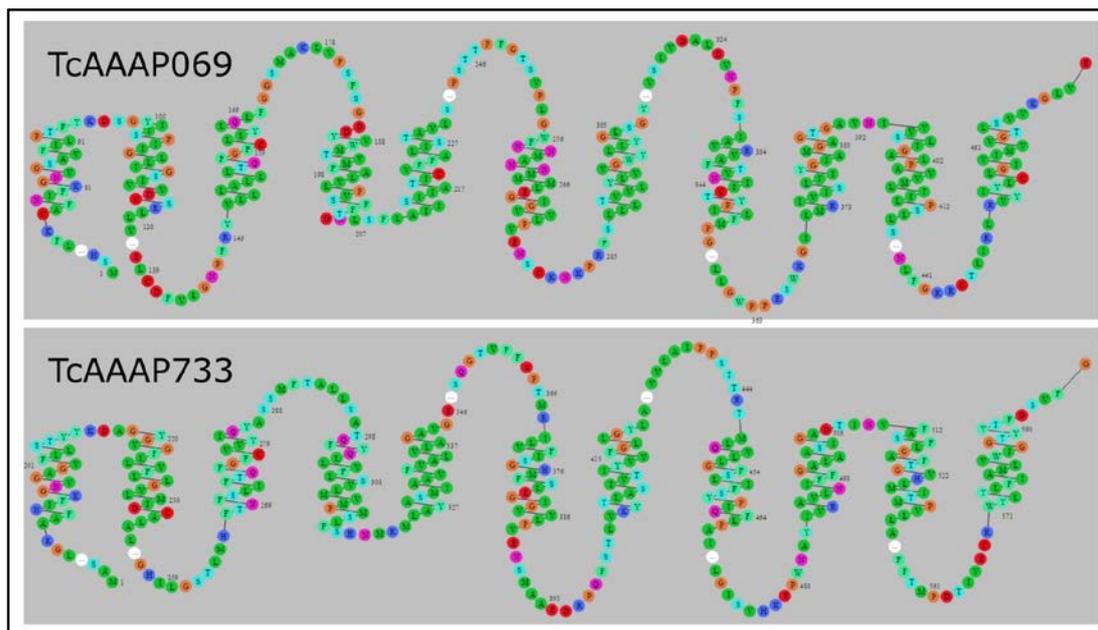
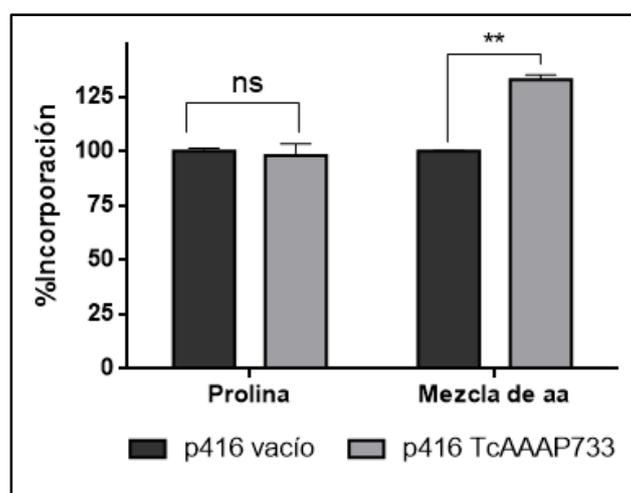


Figura 28. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de los posibles transportadores de prolina TcAAP229 v TcAAP7333 con la secuencia de la permeasa TcAAP069.



**Figura 29.** Topología de los transportadores TcAAAP069 y TcAAAP733. Los círculos en blanco representan un intervalo de aminoácidos no diagramados.

Dado que las levaduras transformadas con el posible transportador de prolina no mostraron un aumento en la incorporación de prolina (Figura 30, izquierda), se evaluó su capacidad de incorporar una mezcla de aminoácidos radioactivos conteniendo alanina, arginina, aspartato, glutamato, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina (Figura 30, derecha). Las levaduras Tc733 presentaron un transporte significativamente más activo de la mezcla de aminoácidos ( $p=0.0014$ ). El o los sustratos del transportador TcAAAP733 aún permanecen desconocidos, pero los resultados confirman que TcAAAP733 codifica una permeasa de aminoácidos funcional y sugieren que transporta al menos 1 de los aminoácidos presentes en la mezcla mencionada, excepto prolina.



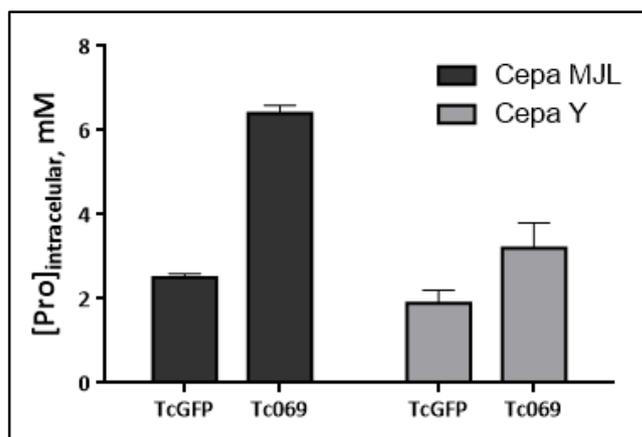
**Figura 30.** Evaluación del transportador TcAAAP733 expresado en levaduras YOR348c. Izquierda: Transporte de prolina. Derecha: Transporte de una mezcla de aminoácidos.

## Capítulo 2. Prolina y estrés

Reportes previos asocian una disminución en la concentración de prolina con una mayor susceptibilidad ante distintas situaciones de estrés en el parásito *T. cruzi* (Magdaleno et al. 2009; Paes et al. 2013). Por este motivo nos propusimos estudiar si la sobre-expresión del transportador de prolina TcAAP069 podría provocar un aumento en la concentración intracelular del aminoácido, y si podría además tener algún efecto en la respuesta a diversas condiciones de estrés, ya sea proveyendo la energía para hacer frente a estas situaciones o capturando radicales libres.

### 2.1 Prolina intracelular y ATP

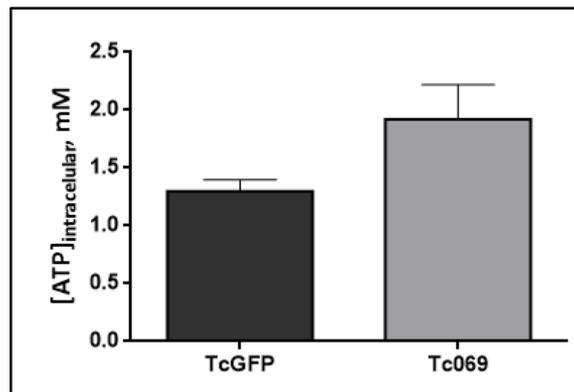
Se evaluó la concentración de prolina intracelular tanto en los parásitos transgénicos Tc069 como en los parásitos control TcGFP a fin de estudiar si este aminoácido estaba siendo acumulado dentro del parásito. Se evaluaron los niveles intracelulares de prolina tanto en la cepa MJL como en la cepa Y. En ambas cepas se observaron mayores concentraciones intracelulares de prolina para los parásitos que sobre-expresan la permeasa TcAAP069 (Figura 31).



**Figura 31.** Medición de prolina intracelular en parásitos Tc069 y TcGFP en cepa MJL (gris oscuro) y cepa Y (gris claro).

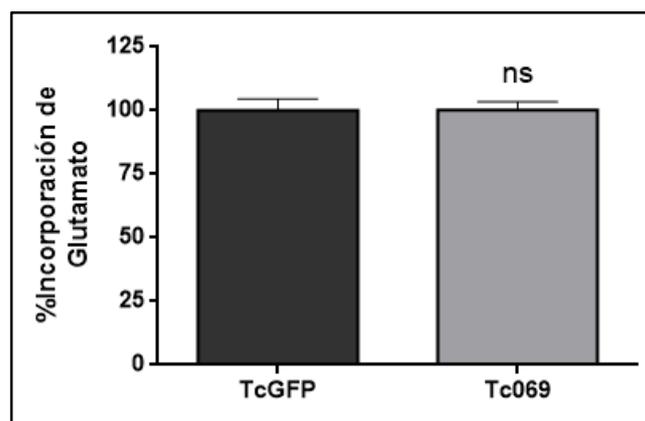
Para la cepa MJL se observó un 156% más de prolina intracelular en los parásitos Tc069 respecto al control TcGFP, con valores de 6.4 mM ( $\pm 0.2$ ) y 2.5 mM ( $\pm 0.1$ ) respectivamente. En el caso de la cepa Y, se observó un 68% más de prolina intracelular, con valores de 3.2 mM ( $\pm 0.3$ ) y 1.9 mM ( $\pm 0.2$ ) para los parásitos Tc069 y TcGFP respectivamente.

Dado que la prolina puede ser convertida en glutamato y luego ingresar al ciclo de Krebs y también puede actuar como dadora directa de electrones en la cadena respiratoria, sería esperable que un aumento en la concentración intracelular de prolina afecte además el balance energético de los parásitos que sobre-expresan la permeasa de prolina TcAAP069 (Figura 32). Efectivamente, los parásitos Tc069 presentaron un 48.3% más de ATP intracelular que los parásitos control, con valores de 1.92 mM ( $\pm 0.3$ ) y 1.30 mM ( $\pm 0.1$ ) respectivamente.



**Figura 32.** Concentración de ATP intracelular en parásitos Tc069 y en parásitos control TcGFP de la cepa MJL.

Como la prolina puede contribuir a un aumento en el *pool* intracelular de glutamato por su conversión a dicho aminoácido, se evaluó si una mayor incorporación de prolina podría afectar el transporte de glutamato. Para ello se comparó el transporte de glutamato entre los parásitos que sobre-expresan la permeasa de prolina TcAAP069 y los parásitos control (TcGFP) (Figura 33). No se observaron diferencias en cuanto a la incorporación de glutamato.



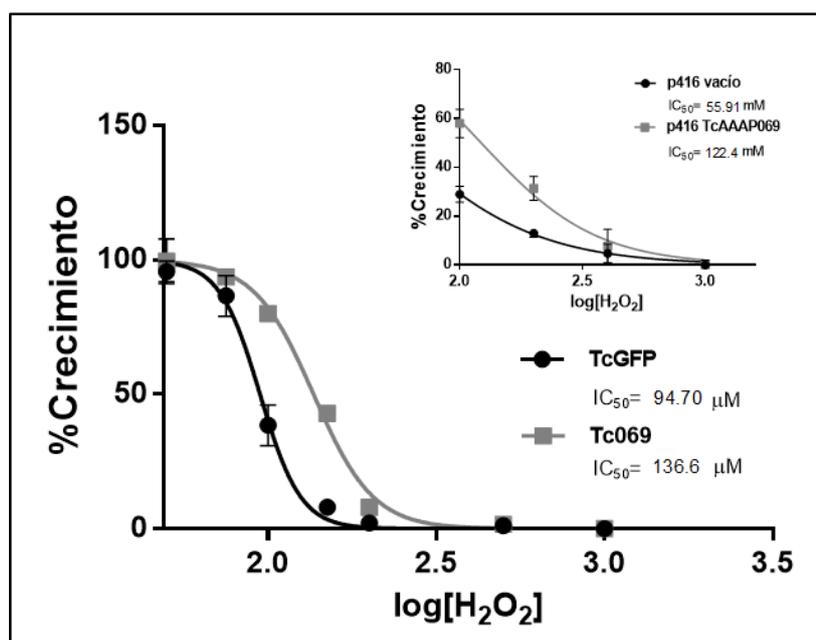
**Figura 33.** Transporte de glutamato en parásitos Tc069 y en parásitos control GFP de la cepa MJL.

## 2.2 Resistencia a estrés oxidativo

El metabolismo de prolina está involucrado en la resistencia a diversas condiciones de estrés en una amplia variedad de organismos. Además en el parásito *T. cruzi* se ha demostrado que la inhibición del metabolismo de prolina disminuye la respuesta ante este tipo de situaciones (Magdaleno et al. 2009). Por este motivo se estudió si el aumento en la incorporación de prolina y en su concentración intracelular causado por la sobre-expresión de la permeasa de prolina TcAAAP069 podría afectar la resistencia al estrés oxidativo.

Como estudio preliminar, se ensayó la resistencia a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en levaduras que sobre-expresan el transportador de prolina TcAAAP069 y en levaduras transformadas con el plásmido de expresión p416 vacío (Figura 34, recuadro interno). Los resultados mostraron que las levaduras Tc069 poseen una resistencia significativamente mayor que las levaduras control ( $p=0.001$ ), con valores de  $IC_{50}$  de 122.4 mM ( $\pm 1.3$ ) y 55.9 mM ( $\pm 0.9$ ), respectivamente.

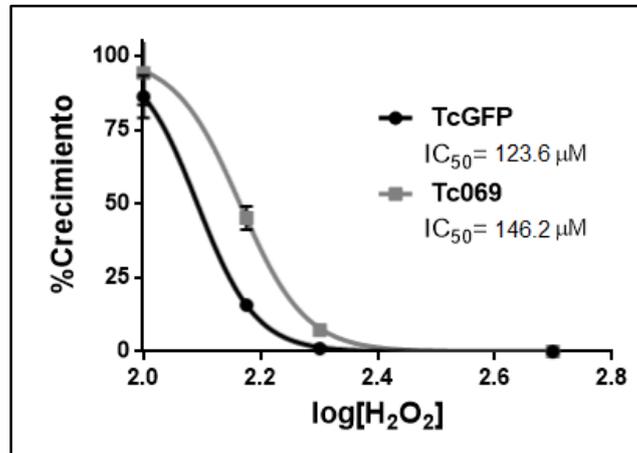
En vista de los prometedores resultados en levaduras, se evaluó la resistencia a estrés oxidativo en parásitos (Figura 34).



**Figura 34.** Tratamiento con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Recuadro interno: Resistencia a estrés oxidativo en levaduras YOR348c transformadas con el plásmido p416 vacío (control) o con el plásmido p416 TcAAAP069. Figura central: Resistencia a estrés oxidativo en parásitos TcGFP y Tc069 de la cepa MJL.

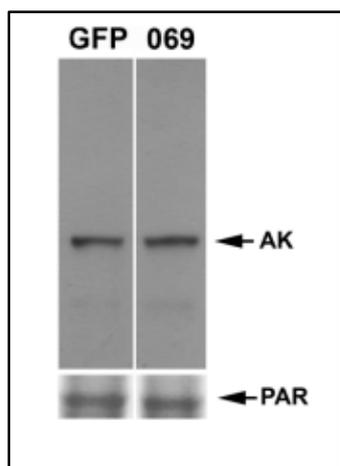
Al igual que en levaduras, la sobre-expresión del transportador TcAAAP069 produjo un aumento significativo en la resistencia de los epimastigotes al estrés oxidativo. Las  $IC_{50}$ s obtenidas fueron significativamente mayores para los parásitos que sobre-expresan la permeasa de prolina ( $p<0.0001$ ), con valores de 136.6  $\mu$ M ( $\pm 0.5$ ) y 94.7  $\mu$ M ( $\pm 0.3$ ) para los parásitos Tc069 y control, respectivamente. En concordancia con estos resultados, la

sobre-expresión del transportador TcAAP069 en la cepa Y también dio como resultado un incremento significativo en la resistencia a estrés oxidativo ( $p=0.0003$ ), con una  $IC_{50}$  de  $146.2 \mu\text{M}$  ( $\pm 0.6$ ) para los parásitos Tc069 y una  $IC_{50}$  de  $123.6 \mu\text{M}$  ( $\pm 0.3$ ) para los parásitos control (Figura 35).



**Figura 35.** Tratamiento con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Resistencia a estrés oxidativo en parásitos TcGFP y Tc069 de la cepa Y.

Dado que la propia prolina podría inducir una respuesta de estrés celular por sobrecarga de la cadena respiratoria a través del aumento de la fosforilación oxidativa, se utilizó la arginina quinasa como proteína control de respuesta a estrés. Trabajos previos muestran que la expresión de la arginina quinasa (AK) aumenta durante condiciones de estrés, por ejemplo estrés nutricional, de pH y oxidativo (Pereira et al. 2003; Miranda et al. 2006). Se evaluó la expresión de dicha enzima mediante Western Blot en parásitos Tc069 y TcGFP sin ser sometidos a ningún tratamiento, y no se observaron diferencias en la expresión (Figura 36).



**Figura 36.** Expresión de arginina quinasa como control del estado oxidativo basal de parásitos TcGFP y Tc069 de la cepa MJL.

Este resultado indicaría que el aumento en la concentración de prolina intracelular no está provocando una condición de estrés oxidativo basal mayor en los parásitos Tc069 y

por lo tanto las diferencias observadas en las respuestas a estrés oxidativo se relacionan directamente con el tratamiento en sí y no con el estado redox de los parásitos utilizados.

### 2.3 Resistencia a estrés nitrosativo

Además del peróxido de hidrógeno, se evaluó la resistencia a óxido nítrico, ya que uno de los mecanismos de defensa del hospedador mamífero involucra la producción de óxido nítrico para enfrentar la invasión de los tripomastigotes (Costa et al. 2006). Para ello se utilizó un dador de óxido nítrico a fin de emular la producción de dicho compuesto por los macrófagos ante la infección con *T. cruzi* en el cuerpo humano (Figura 37).

Los parásitos Tc069 mostraron una resistencia a óxido nítrico 2.12 veces mayor que los parásitos control ( $p < 0.0001$ ), con valores de  $IC_{50}$  de 1.14 mM ( $\pm 0.04$ ) y 0.54 mM ( $\pm 0.01$ ), respectivamente.

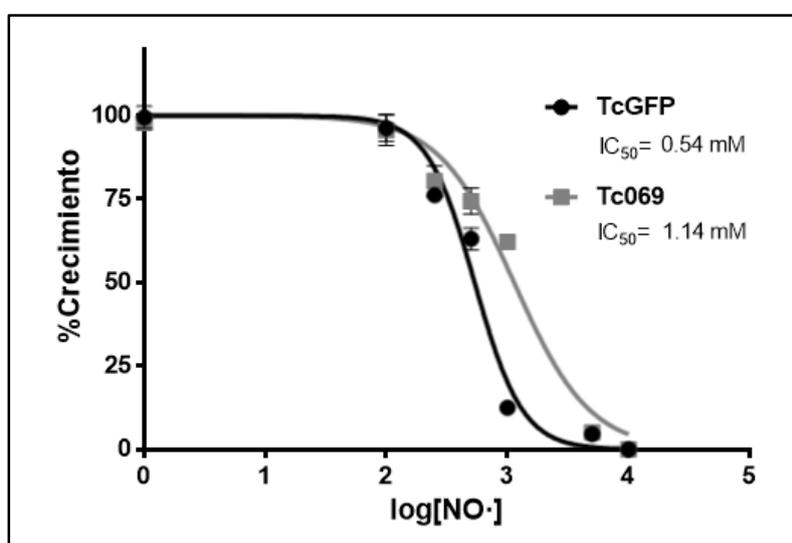


Figura 37. Tratamiento con DEA-NONOato (dador de  $NO\cdot$ ). Resistencia a estrés nitrosativo en parásitos TcGFP y Tc069 de la cepa MJL.

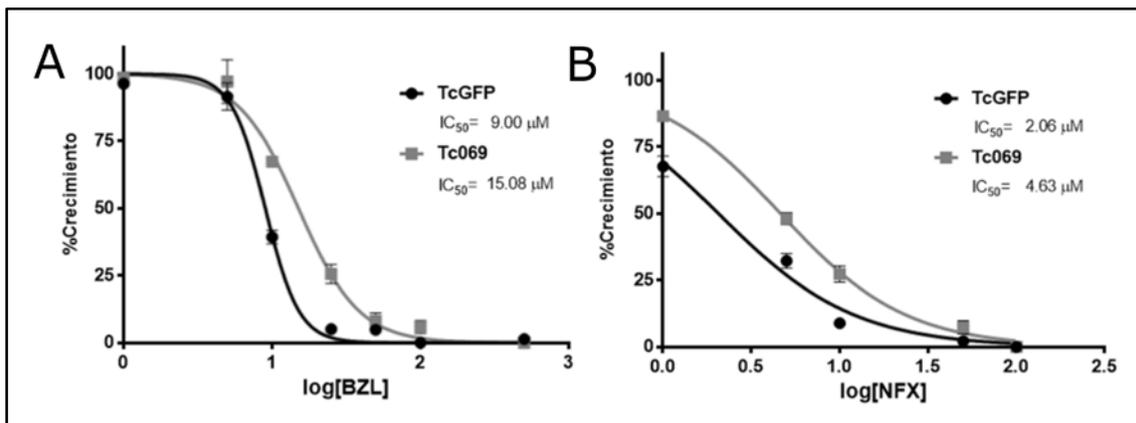
### 2.4 Resistencia a drogas tripanocidas

Teniendo en cuenta que los parásitos Tc069 fueron más resistentes tanto al peróxido de hidrógeno como al óxido nítrico, a continuación se ensayaron las dos drogas tripanocidas disponibles actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, el benznidazol y el nifurtimox (Figura 38), ya que se ha reportado que ambas drogas ejercen su efecto tripanocida, al menos en parte, a través de la generación de estrés oxidativo (Hall et al. 2011; Hall & Wilkinson 2012; Rajão et al. 2014).

Nuevamente los parásitos que sobre-expresan la permeasa de prolina mostraron una resistencia significativamente mayor al ser tratados con ambas drogas tripanocidas. En el caso del benznidazol la  $IC_{50}$  resultó ser un 68% mayor para los parásitos Tc069 ( $p < 0.0001$ ) y un 125% mayor al tratarlos con nifurtimox ( $p < 0.0001$ ). Los valores de  $IC_{50}$

obtenidos fueron  $15.08 \mu\text{M}$  ( $\pm 0.27$ ) y  $9.00 \mu\text{M}$  ( $\pm 0.10$ ) para el benznidazol, y  $4.63 \mu\text{M}$  ( $\pm 0.12$ ) y  $2.06 \mu\text{M}$  ( $\pm 0.26$ ) para el nifurtimox, correspondientes a los parásitos Tc069 y TcGFP, respectivamente.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la prolina misma es un componente fundamental en los mecanismos de defensa celular ante una amplia variedad de condiciones adversas.



**Figura 38.** Tratamiento con drogas tripanocidas en cepa MJL. A) Resistencia a benznidazol en parásitos TcGFP y Tc069 de la cepa MJL. B) Resistencia a nifurtimox en parásitos TcGFP y Tc069 de la cepa MJL.



# Capítulo 3. Regulación del transporte de prolina

## 3.1 Actividad, expresión y localización del transportador de prolina a lo largo del crecimiento

En experimentos previos se observó que el transporte de prolina era indetectable en parásitos Tc069 en fase estacionaria, por lo que se decidió estudiar durante 10 días la incorporación de prolina en parásitos *wild-type* de la cepa Y (Figura 39). Se utilizó la evolución del crecimiento en cultivo como situación que emula las distintas condiciones nutricionales de los parásitos en su ciclo de vida. Los resultados evidenciaron que efectivamente el transporte de prolina varía durante el crecimiento de los parásitos en cultivo, presentando una velocidad máxima de 30.7 pmol pro/min cuando la densidad del cultivo se encuentra aproximadamente en  $1.5 \times 10^7$  parásitos/ml.

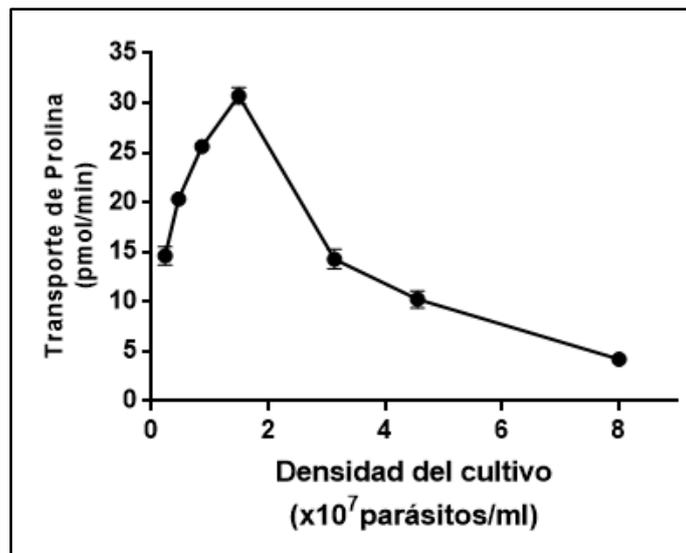


Figura 39. Seguimiento del transporte de prolina en parásitos *wild-type* durante 10 días.

Se realizaron varios intentos para producir anticuerpos  $\alpha$ -TcAAAP069 a fin de poder evaluar el comportamiento de la proteína endógena en parásitos *wild-type* y además compararla con la proteína recombinante en parásitos Tc069. El primer problema fue la producción de la proteína recombinante fusionada a un *tag* de 6 histidinas (6xHis) (para facilitar su posterior purificación), ya que la permeasa TcAAAP069 posee 11 pasos transmembrana y por tanto su expresión y plegamiento en un sistema heterólogo como *Escherichia coli* no son sencillos. Ante la falta de resultados, se optó por expresar sólo los primeros 76 aminoácidos del extremo N-terminal (la región más variable entre los miembros de la familia TcAAAP) con el *tag* 6xHis, y de este modo se obtuvo un péptido de aproximadamente 13 kDa (112 aminoácidos) purificado con una resina de níquel-agarosa y confirmado por Western Blot con un anticuerpo comercial  $\alpha$ -His. El péptido además fue analizado por MALDI-TOF/TOF en el servicio CEQUIBIEM (Centro de Estudios

Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masas) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Una vez confirmada su identidad se procedió a inocular ratones. Como no se obtuvieron anticuerpos, se cambió de modelo animal y se inocularon ratas. Tampoco se obtuvieron anticuerpos, por lo que se decidió continuar estudiando la regulación del transporte de prolina mediado por la permeasa TcAAP069 en los parásitos transgénicos Tc069 ya que se puede seguir la expresión y localización de la proteína gracias a su fusión en el extremo N-terminal al *tag* 3xFlag.

Se procedió entonces a evaluar el transporte de prolina durante la curva de crecimiento de los parásitos que sobre-expresan la permeasa de prolina TcAAP069 (Figura 40, color negro). Luego del repique y durante los primeros 5 días del cultivo, la velocidad del transporte de prolina se incrementó desde niveles indetectables hasta 264 pmol pro/min en el día 4 (correspondiente con una densidad aproximada de  $0.48 \times 10^7$  parásitos/ml), y presentó un máximo en la velocidad de transporte con valores alrededor de 320 pmol pro/min en los días 5 y 6 (densidades de cultivo entre  $1.1 \times 10^7$  y  $1.7 \times 10^7$  parásitos/ml). A partir del día 6 y hasta el día 10 la velocidad de incorporación de prolina disminuyó en forma gradual hasta ser indetectable en la fase exponencial tardía (día 10, densidad celular de aproximadamente  $10 \times 10^7$  parásitos/ml) y en la fase estacionaria (datos no mostrados).

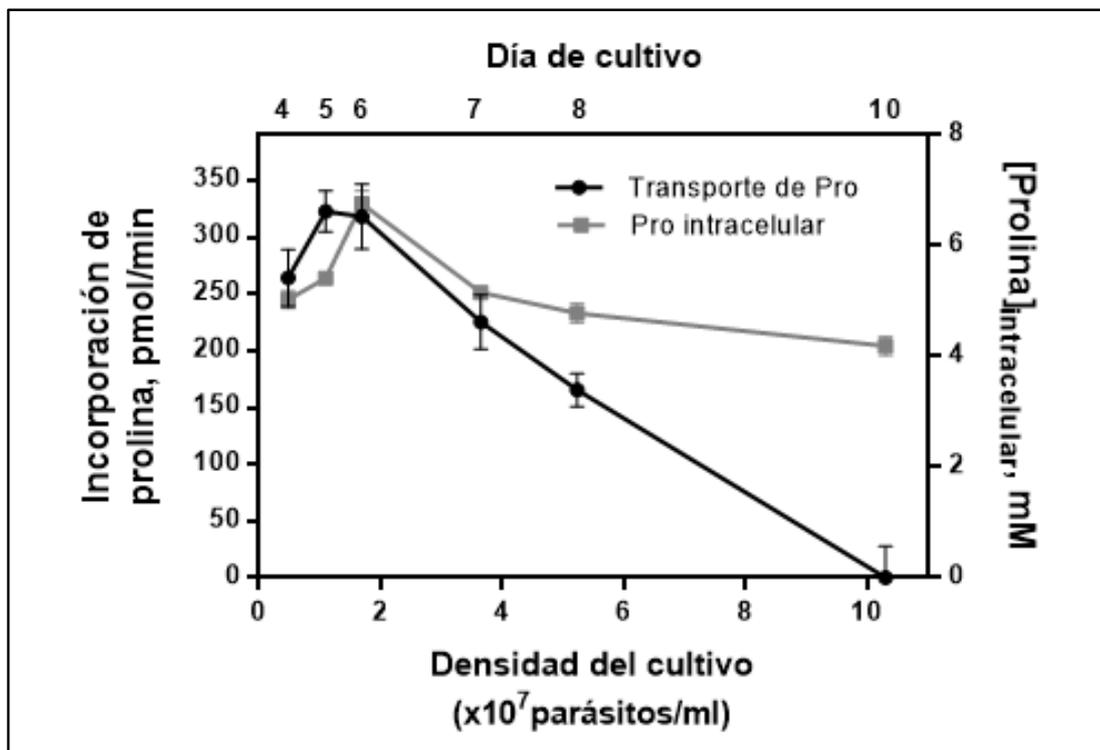
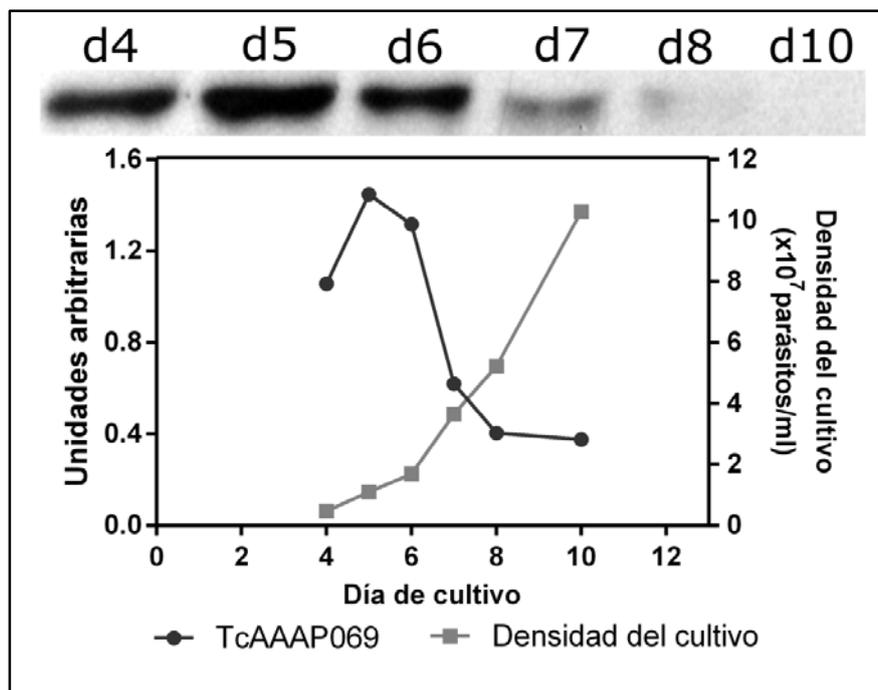


Figura 40. Seguimiento del transporte de prolina (línea negra) y su concentración intracelular (línea gris) en parásitos Tc069 de la cepa Y.

Dado que podrían existir mecanismos compensatorios ante el aumento en la incorporación de prolina, las variaciones observadas en el transporte no necesariamente implican diferencias en el nivel intracelular de dicho aminoácido. Por este motivo, la

concentración de prolina intracelular fue determinada en simultáneo con los ensayos de transporte a fin de establecer si los niveles de prolina se correlacionan con las tasas de transporte observadas a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 40, color gris). La máxima concentración de prolina se encontró en el día 6, correspondiente con uno de los máximos para la velocidad del transporte de prolina. Además, a medida que la tasa de transporte disminuyó a niveles indetectables, la concentración de prolina también decreció de 6.8 mM en el día 6 hasta 4.2 mM en el día 10 y se mantuvo constante hasta el siguiente repique. A fin de evaluar cómo varía la disponibilidad de prolina durante el progreso del cultivo, se cuantificó la concentración de prolina extracelular en muestras de medio de cultivo fresco y en medio obtenido de un cultivo de día 15. No se encontraron diferencias significativas entre ambos medios, con valores de prolina de 5 mM ( $\pm 0.5$ ) y 4.7 mM ( $\pm 0.4$ ) respectivamente.

El ensayo de Western Blot para evaluar la expresión de la permeasa de prolina TcAAAP069 durante el crecimiento de los parásitos en cultivo se realizó utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -Flag comercial, ya que la construcción plasmídica con la que fueron electroporados los parásitos contiene el gen del transportador TcAAAP069 fusionado en el extremo N-terminal a dicho *tag* (Figura 41).



**Figura 41.** Expresión del transportador de prolina a lo largo de la curva de crecimiento. Arriba: Resultados del Western Blot con el anticuerpo comercial  $\alpha$ -Flag. Abajo: Cuantificación de la expresión de la permeasa TcAAAP069 (línea gris oscuro) y Densidad del cultivo (línea gris claro).

Los resultados se correlacionaron con la información obtenida para la actividad de la permeasa de prolina. La expresión del transportador TcAAAP069 presentó un máximo en el día 5 (coincidente con la máxima actividad) y a partir del día 6 la expresión disminuyó y no fue detectada a partir del día 8.

En cuanto al crecimiento de los parásitos Tc069, los epimastigotes presentaron una primera fase de crecimiento hasta el día 6 (fase de adaptación) y una segunda fase entre los días 6 y 10 (fase exponencial), con incrementos en la densidad del cultivo desde  $0.5 \times 10^7$  parásitos/ml por día en la primera fase ( $R^2=0.97$ ) hasta  $2.15 \times 10^7$  parásitos/ml por día en la segunda ( $R^2=0.99$ ). Luego de esta segunda fase los parásitos ingresaron en la fase estacionaria (Figura 42).

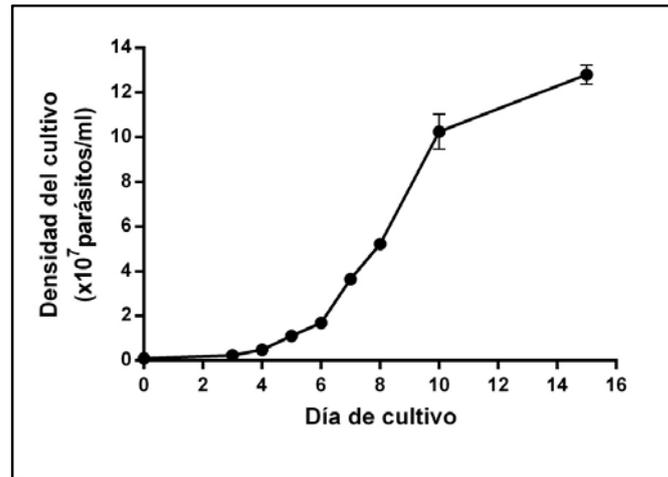
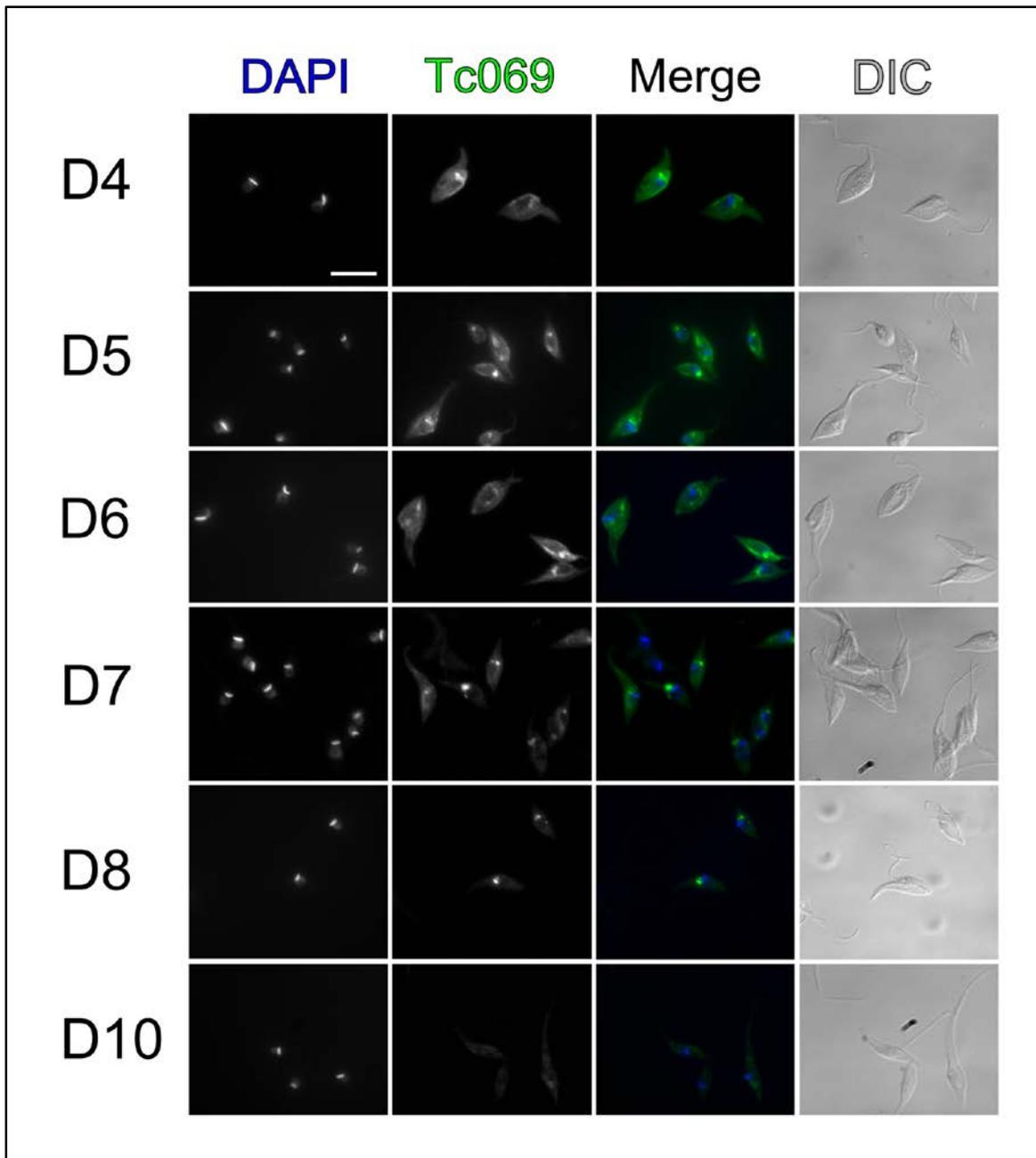


Figura 42. Curva de crecimiento de los parásitos Tc069 de la cepa Y.

El inicio de la fase de crecimiento exponencial (día 6) se correlacionó con la máxima concentración intracelular de prolina (6.8 mM), sugiriendo que la acumulación del aminoácido es esencial para incrementar las tasas de replicación de los parásitos.

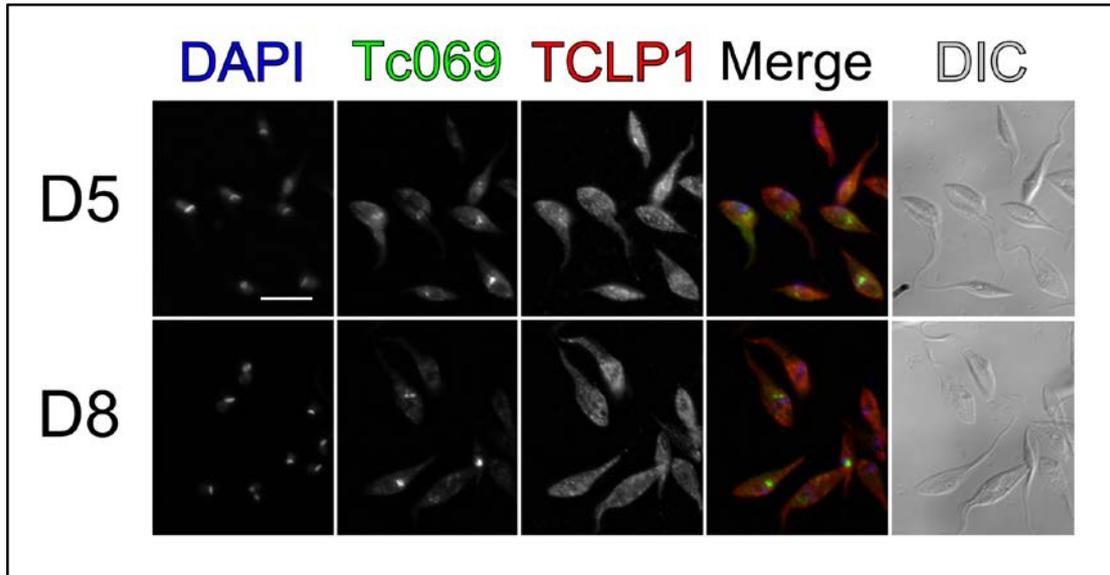
El análisis por inmunofluorescencia indirecta de la expresión de la permeasa TcAAP069 reveló que el transportador de prolina se expresa desde el día 4 hasta el día 8, y luego de ese día no pudo ser detectado (Figura 43). A lo largo de ese período, el transportador se localizó cerca del bolsillo flagelar, en concordancia con reportes previos de otros transportadores de aminoácidos del parásito *T. cruzi*, pero también se localizó en la membrana plasmática en los días 4, 5 y 6. Además se analizó la co-localización con la proteína TCLP1 (*Trypanosomatid Cest-like Protein 1*), una proteína de *T. cruzi* que se localiza predominantemente en la porción intracelular del bolsillo flagelar y que podría estar asociada a procesos endocíticos (Durante et al. 2015). La internalización del transportador para su posterior degradación era una posible explicación para la menor actividad cuando la permeasa sólo se localizaba en la región cercana al bolsillo y por eso se realizó esta co-localización. Se utilizaron parásitos Tc069 de día 5 (densidad celular aproximada  $1 \times 10^7$  parásitos/ml) y parásitos de día 8 (densidad celular aproximada  $7 \times 10^7$

parásitos/ml) (Figura 44). No se observó co-localización entre las proteínas TCLP1 y TcAAAP069.



**Figura 43.** Localización de la permeasa de prolina durante el crecimiento de los parásitos Tc069. Se utilizaron parásitos transgénicos Tc069 que sobre-expresan la permeasa TcAAAP069 fusionada al *tag* 3xFlag. TcAAAP069 (verde) y DAPI (azul). La barra blanca corresponde a 5  $\mu$ m.

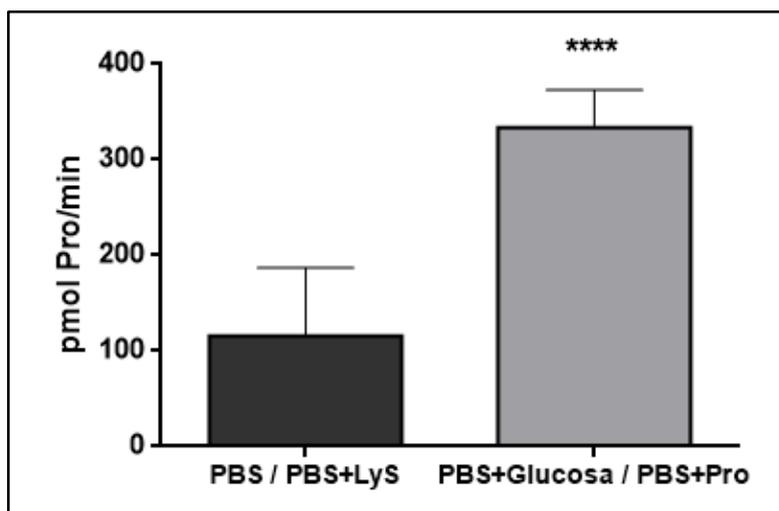
Con el fin de descartar que la falta de detección del transportador de prolina TcAAAP069 a partir del día 8 se debiera a algún fenómeno no relacionado, se evaluó la viabilidad de los parásitos control y de los que sobre-expresan la permeasa de prolina, ambos provenientes de un cultivo de día 10. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad para ambos cultivos (73%  $\pm$ 7 y 68%  $\pm$ 10 para parásitos Tc069 y TcGFP respectivamente).



**Figura 44.** Co-localización del transportador de prolina con la proteína TCLP1. Se utilizaron parásitos transgénicos Tc069 que sobre-expresan la permeasa TcAAAP069 fusionada al *tag* 3xFlag. TcAAAP069 (verde), TCLP1 (rojo) y DAPI (azul). La barra blanca corresponde a 5  $\mu$ m.

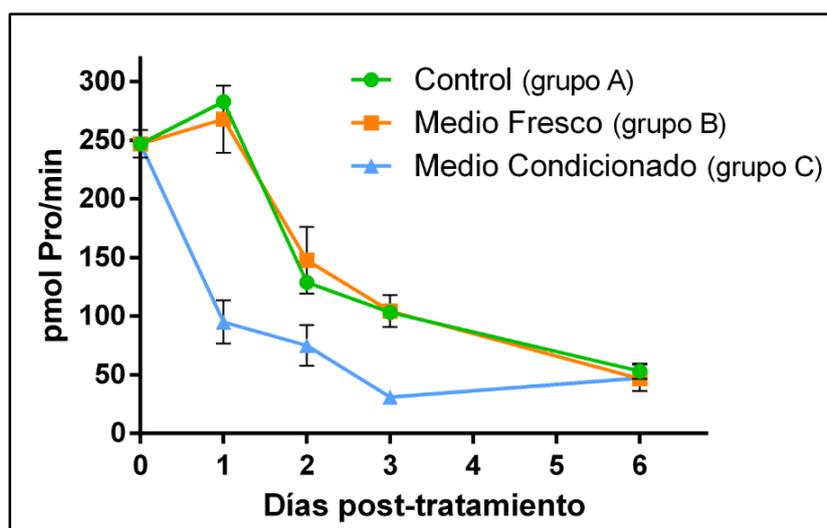
### 3.2 Evaluación del transporte en distintas condiciones

Para encontrar posibles moduladores del transporte de prolina, primero se evaluó la regulación por disponibilidad de sustrato, a pesar de que la concentración de prolina extracelular no varía en el medio de cultivo. Se midió el transporte de prolina en parásitos Tc069 incubados durante 24 hs en distintas condiciones: 1) PBS sólo, 2) PBS suplementado con prolina 10 mM, o 3) PBS suplementado con lisina 10 mM, un aminoácido no relacionado. Dado que la prolina puede ser utilizada como fuente de energía y su transporte requiere energía, también se midió el transporte en parásitos Tc069 incubados en PBS suplementado con glucosa 10 mM. Además se evaluó la viabilidad celular de los parásitos Tc069 antes y después de 24 hs de ayuno en PBS y no se observaron diferencias ( $100\% \pm 0.9$  y  $97\% \pm 0.4$ , respectivamente). En parásitos incubados en PBS-prolina o PBS-glucosa se observó que la incorporación de prolina aumentó 2.9 veces ( $\pm 0.28$ ) al comparar el transporte de prolina con los parásitos incubados en PBS-lisina o PBS sólo ( $p < 0.0001$ ) (Figura 45). No hubo diferencias significativas al comparar PBS-prolina contra PBS-glucosa o PBS-lisina contra PBS sólo. Estos resultados apoyan la hipótesis de que tanto la prolina como la glucosa proveerían la energía necesaria para la incorporación de prolina sin regular específicamente el transporte.



**Figura 45.** Transporte de Prolina en distintas condiciones para ver regulación por disponibilidad de sustrato en parásitos Tc069. Se muestran los promedios de las velocidades de incorporación de prolina para los parásitos ayunados en PBS solo (PBS) o en PBS suplementado con lisina (PBS+Lys), o bien en PBS suplementado con glucosa o con prolina (PBS+Glucosa o PBS+Pro, respectivamente).

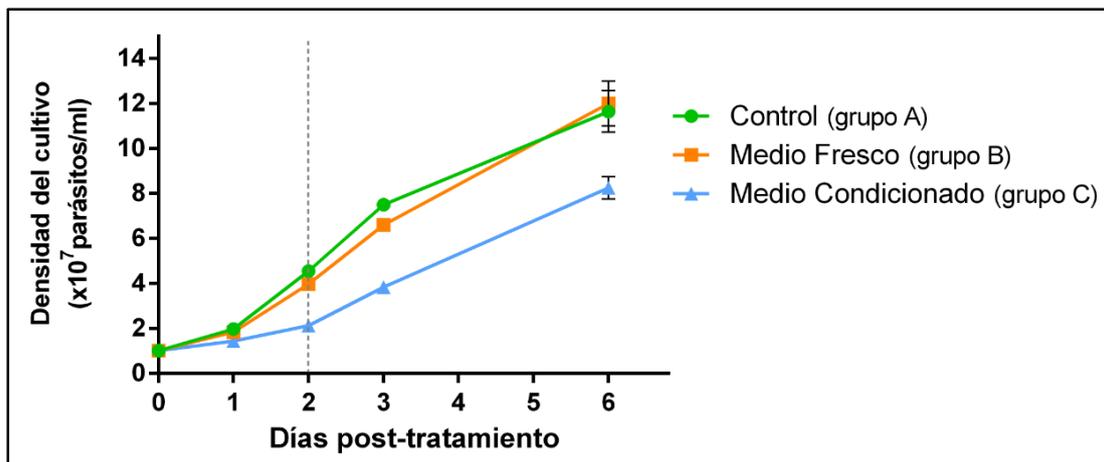
A continuación se estudió la posibilidad de que algún componente del medio estuviera influyendo en el transporte de prolina. Para ello se modificaron las condiciones de cultivo de parásitos de día 5 ( $1 \times 10^7$  parásitos/ml) que sobre-expresan la permeasa de prolina TcAAP069. Por un lado se mantuvieron en el mismo medio en que se encontraban (grupo A, control), y por otro lado se pasaron a medio fresco (grupo B, fresco) o medio condicionado obtenido de un cultivo de día 15 (grupo C, condicionado) (Figura 46). El transporte de prolina se evaluó durante 6 días luego del tratamiento. A las 24 hs, los grupos A y B mostraron un ligero incremento en el transporte de prolina, mientras que en el grupo C se produjo una disminución de casi 3 veces. Estos resultados



**Figura 46.** Transporte de Prolina en distintas condiciones de medio de cultivo. Un cultivo de día 5 de parásitos Tc069 fue dividido en 3 partes iguales que luego de ser centrifugadas fueron resuspendidas en el medio en que se encontraban (grupo A, control), en medio fresco (grupo B) o en medio condicionado obtenido de un cultivo de día 15 (grupo C). Se evaluó el transporte de prolina durante 6 días luego de la modificación del medio de cultivo.

indicarían el efecto de componentes del medio condicionado sobre el transporte de prolina. El grupo C alcanzó la mínima tasa de transporte en el día 3 post-tratamiento, mientras que en los grupos A y B la tasa de transporte disminuyó continuamente hasta el día 6. Como se mencionó anteriormente no se observaron diferencias significativas en la concentración de prolina en los medios utilizados.

En cuanto al crecimiento de los cultivos, si bien los parásitos resuspendidos en medio condicionado (grupo C) presentaron un crecimiento casi nulo en las primeras 48 hs post-tratamiento, la pendiente estimada en el crecimiento para los días siguientes no presentó diferencias significativas ( $p=0.1414$ ) con respecto a la estimada para el grupo A (control) y B (medio fresco) (Figura 47). Estos resultados indicarían que las diferencias observadas en la actividad del transportador TcAAP069 se deben a algún factor desconocido presente en el medio condicionado, ya que si bien los parásitos enlentecen su tasa de replicación al ser cultivados en medio condicionado, luego recuperan plenamente su capacidad replicativa, no así su capacidad de incorporar prolina.

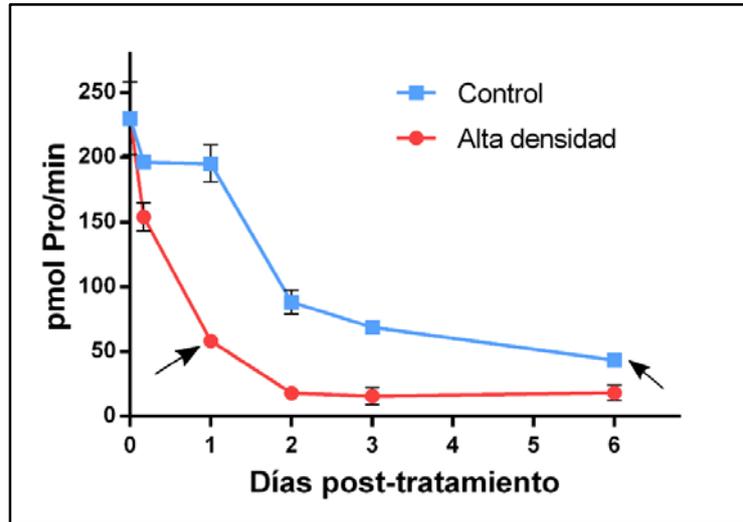


**Figura 47.** Densidad celular de los cultivos de parásitos Tc069 en distintas condiciones de medio (ver Figura 46). Se midió la densidad celular de cada cultivo durante 6 días luego de la modificación del medio de cultivo.

En conjunto, los resultados obtenidos estarían evidenciando la existencia de un factor desconocido asociado a la densidad celular. Para poder evaluar esta hipótesis se utilizaron parásitos Tc069 de un cultivo de día 5 ( $1 \times 10^7$  parásitos/ml), los cuales fueron concentrados hasta una densidad final de  $7 \times 10^7$  parásitos/ml (cultivo de alta densidad, equivalente a un día 8 de cultivo) o mantenidos en su densidad original (cultivo control). En ambos casos los parásitos fueron resuspendidos en medio fresco y el transporte de prolina fue evaluado durante 6 días luego del tratamiento. En concordancia con los resultados obtenidos en el experimento anterior, luego de 24 hs post-tratamiento la tasa de transporte de prolina se mantuvo constante en los parásitos control y disminuyó aproximadamente 3 veces en el cultivo concentrado artificialmente (Figura 48). En el cultivo de alta densidad se alcanzó el mínimo transporte de prolina en el día 2 post-

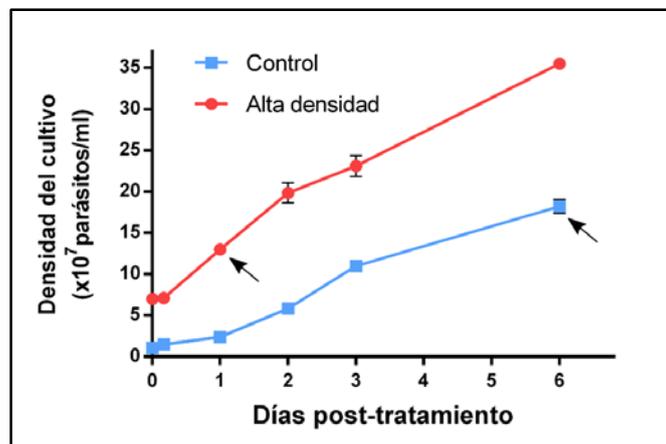


tratamiento, mientras que para el cultivo control la tasa de transporte disminuyó continuamente hasta el día 6.



**Figura 48.** Transporte de prolina en parásitos Tc069 de cultivos concentrados artificialmente (alta densidad) o control. Parásitos de un cultivo de día 5 de parásitos Tc069 fueron recolectados y resuspendidos en la misma densidad celular en que se encontraban ( $1 \times 10^7$  parásitos/ml, cultivo control) o bien fueron concentrados hasta una densidad de  $7 \times 10^7$  parásitos/ml. Se midió la velocidad del transporte de prolina durante 6 días luego de concentrar o no el cultivo. Se indican con flechas la comparación entre el día 1 del cultivo concentrado y el día 6 del cultivo control.

Interesantemente, el transporte observado para el grupo control en el día 6 fue similar que el presentado por el cultivo de alta densidad en el día 1 ( $58.3 \text{ pmol pro/min} \pm 5.1$  y  $43.5 \text{ pmol pro/min} \pm 4.4$ , respectivamente, ver flechas en Figura 48) y de hecho, las densidades del cultivo en esos días post-tratamiento fueron similares también ( $18.2 \times 10^7$  y  $13.0 \times 10^7$  parásitos/ml, respectivamente, ver flechas en Figura 49). De acuerdo a la bibliografía, el agotamiento de los componentes del medio de cultivo en sólo 24 hs es improbable y por lo tanto la acumulación de algún factor asociado a la densidad celular resulta una explicación más factible (Alonso et al. 2001).



**Figura 49.** Densidad celular de los cultivos de parásitos Tc069 concentrados artificialmente (alta densidad) o control (ver Figura 48). Se midió la densidad celular durante 6 días. Se indican con flechas la comparación entre el día 1 del cultivo concentrado y el día 6 del cultivo control.

# Capítulo 4. Análogos de prolina

## 4.1 Estructura de los análogos de prolina

Los compuestos fueron diseñados en el laboratorio del Dr. Guillermo Labadié (Instituto de Química Rosario, IQUIR-CONICET). Se sintetizó un *pool* de compuestos, los cuales fueron ensayados por su actividad tripanocida en epimastigotes *wild-type* de la cepa de *T. cruzi* CL14 (DTU TcVI).

Los compuestos se generaron mediante el agregado a la L-prolina de un anillo triazólico y una cadena alifática de longitud y grado de saturación variable.

Los 4 compuestos que presentaron efecto tripanocida debajo de una concentración 50  $\mu\text{M}$  y baja toxicidad en células de mamíferos son los análogos que se utilizaron en este capítulo a fin de evaluar si su actividad es ejercida sobre o mediante el transportador de prolina TcAAAP069. Las  $\text{IC}_{50}$ s obtenidas para la acción tripanocida de los compuestos en las condiciones ensayadas por el grupo del Dr. Labadié se encuentran en la Tabla II.

Tabla II.  $\text{IC}_{50}$ s de los análogos de prolina obtenidas por el grupo del Dr. Labadié.

Compuesto	$\text{IC}_{50}$
ITP-1B	28 $\mu\text{M}$
ITP-1C	39 $\mu\text{M}$
ITP-1D	25 $\mu\text{M}$
ITP-1G	49 $\mu\text{M}$

Las estructuras de los análogos se encuentran esquematizadas en la Figura 50.

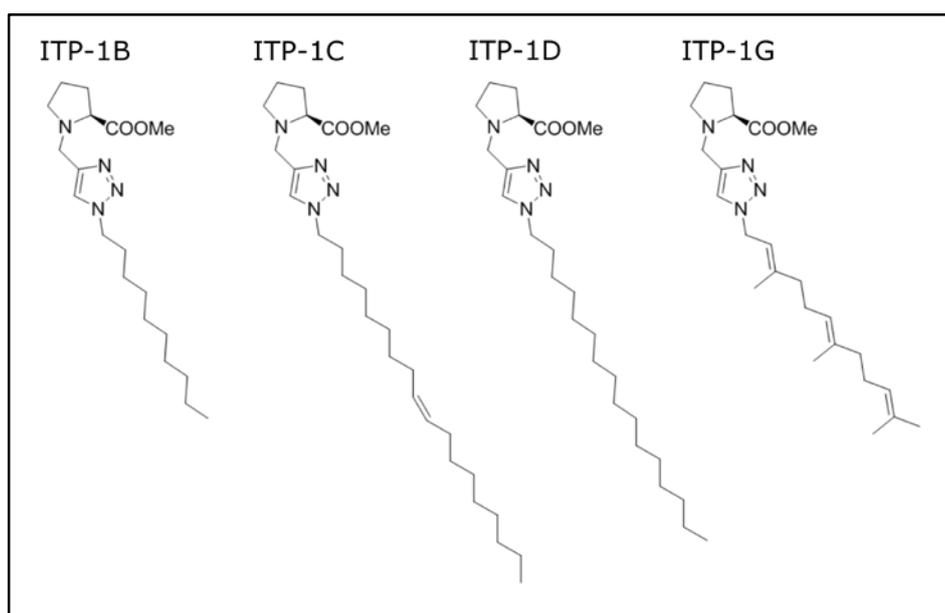


Figura 50. Estructura de los análogos de prolina sintetizados en el IQUIR-CONICET y utilizados en este trabajo.

## 4.2 Inhibición del transporte de prolina

Con el fin de estudiar la posibilidad de que los análogos inhiban la actividad del transportador de prolina TcAAP069, se midió la tasa de incorporación de dicho aminoácido en presencia de cada uno de los análogos en parásitos transgénicos control (TcGFP) y en parásitos que sobre-expresan la permeasa de prolina (Tc069) (Figura 51). Dado que los parásitos Tc069 tienen incrementado aproximadamente 9 veces el transporte de prolina (Figura 20, ver página 74), si los análogos afectan la actividad de la permeasa TcAAP069 el efecto inhibitorio en el transporte de prolina debería ser mayor en estos parásitos. Inicialmente se evaluaron los compuestos en una concentración 40  $\mu$ M, un valor intermedio para las IC<sub>50</sub>s mencionadas equivalente a 7.25 veces menos que la Km aparente obtenida para el transportador de prolina TcAAP069 sobre-expresado en la cepa Y (Km= 0.29mM).

De los compuestos ensayados, el análogo ITP-1G fue el único que inhibió significativamente el transporte de prolina en los parásitos TcGFP, con un 33.1% ( $\pm$ 4.2) de inhibición ( $p < 0.0001$ ). Los compuestos ITP-1B, ITP-1C e ITP-1D no presentaron inhibición significativa (Figura 51, panel izquierdo).

En los ensayos realizados con parásitos que sobre-expresan el transportador de prolina TcAAP069, también el análogo ITP-1G fue el único que inhibió significativamente el transporte de prolina, con un 51.9% ( $\pm$ 11.2) de inhibición ( $p = 0.0005$ ). Al igual que con los parásitos TcGFP, no se observó efecto inhibitorio con los análogos ITP-1B, ITP-1C e ITP-1D (Figura 51, panel derecho).

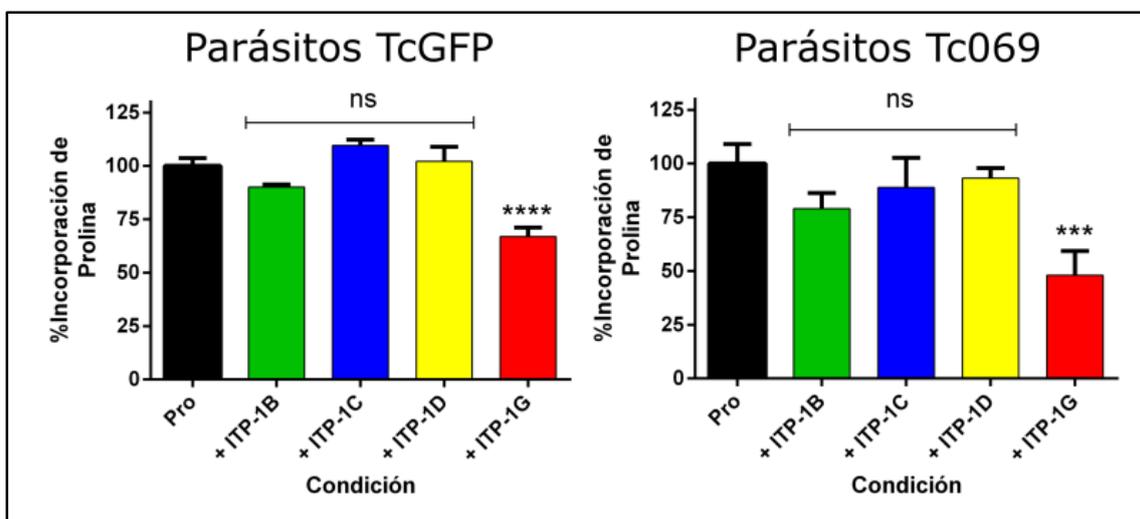


Figura 51. Competencia de los análogos en el transporte de prolina en parásitos TcGFP (panel izquierdo) y Tc069 (panel derecho).

Los resultados parecen indicar que el análogo ITP-1G inhibe el transporte de prolina mediado por el transportador TcAAP069, dado que dicho efecto parece estar aumentado por la sobre-expresión de dicha permeasa.

### 4.3 Inhibición dosis-dependiente

El análogo ITP-1G fue el único compuesto que produjo una inhibición significativa del transporte de prolina en una concentración de 40  $\mu\text{M}$  tanto en parásitos TcGFP como Tc069. Sin embargo, es posible que los otros compuestos también tengan efecto sobre el transporte pero en concentraciones mayores. Por este motivo se realizaron curvas de transporte con parásitos Tc069 en un rango de concentraciones entre 0 y 100  $\mu\text{M}$  para cada análogo (Figura 52).

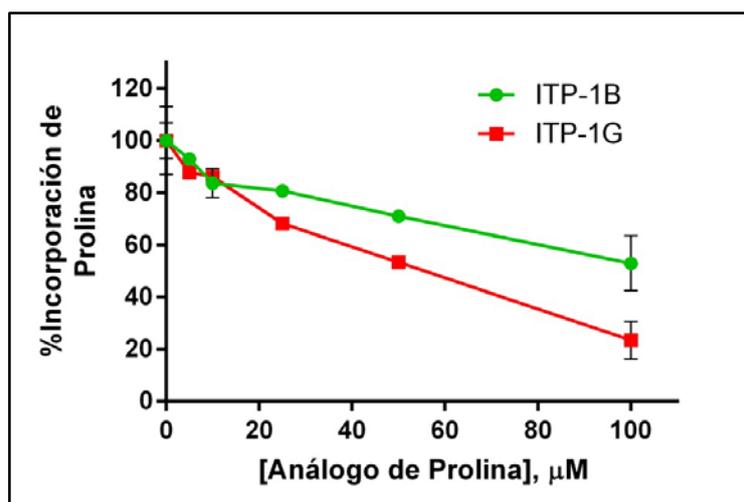


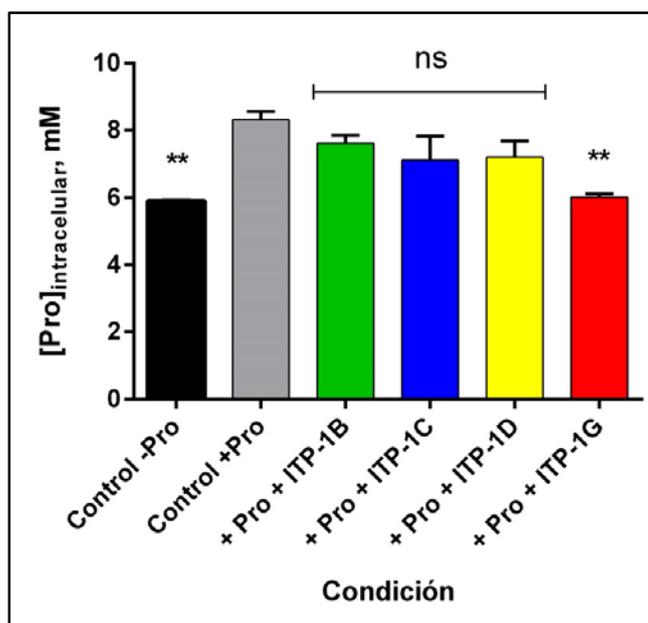
Figura 52. Inhibición concentración-dependiente con los análogos ITP-1B (color verde) e ITP-1G (color rojo).

Nuevamente los compuestos ITP-1C e ITP-1D no presentaron diferencias en el transporte de prolina. Sin embargo, tanto el análogo ITP-1B como el compuesto ITP-1G presentaron una inhibición dosis-dependiente, siendo mayor la inhibición para el análogo ITP-1G. Por ejemplo, al tratar los parásitos con 25  $\mu\text{M}$ , la inhibición observada fue de 19.28% ( $\pm 0.36$ ) y 31.83% ( $\pm 2.15$ ) para los análogos ITP-1B y ITP-1G, respectivamente. En la máxima concentración ensayada (100  $\mu\text{M}$ ) la inhibición alcanzada con el compuesto ITP-1G fue 62% mayor que la obtenida con ITP-1B (76.58%  $\pm 7.21$  y 47.03%  $\pm 10.52$  respectivamente). Estos resultados muestran que la inhibición ejercida por ambos compuestos es dosis-dependiente y podría explicar por qué el efecto del análogo ITP-1B no fue detectado utilizando sólo 40  $\mu\text{M}$ . Dado que el compuesto ITP-1G es el análogo que presentó mejores resultados hasta el momento, se mantuvo la concentración 40  $\mu\text{M}$  para los ensayos que requerían un único tratamiento a fin de seguir comparando la eficiencia de los cuatro compuestos.

### 4.4 Concentración intracelular de prolina

Se determinó la concentración de prolina intracelular mediante un método colorimétrico antes y después de incubar los parásitos transgénicos Tc069 durante 1 h con cada uno de los análogos en presencia de prolina 10 mM (Figura 53).

La concentración basal de prolina intracelular previa a la incubación de 1 hora en presencia de prolina 10 mM fue de 5.90 mM ( $\pm 0.01$ ), mientras que luego de la incubación fue de 8.32 mM ( $\pm 0.24$ ). Esto representa un 41% de incremento en la concentración de prolina. Entre los parásitos sin tratamiento y los parásitos tratados con los análogos ITP-1B, ITP-1C e ITP-1D no se observaron diferencias significativas en la concentración de prolina luego de 1 h de incubación (7.62 mM  $\pm 0.24$ , 7.12 mM  $\pm 0.72$  y 7.21 mM  $\pm 0.48$ , respectivamente). Por otro lado, los parásitos Tc069 tratados con el análogo ITP-1G no mostraron aumento en la concentración de prolina intracelular durante la hora de incubación en prolina 10 mM (5.90 mM  $\pm 0.01$  y 6.02 mM  $\pm 0.10$ , antes y después de la incubación respectivamente).



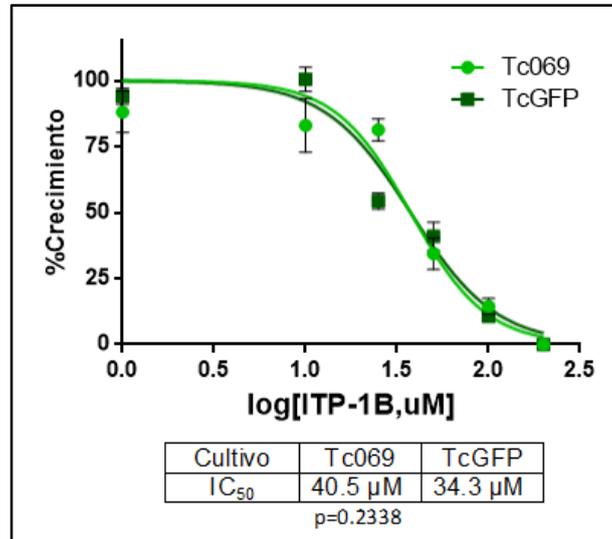
**Figura 53.** Concentración de prolina intracelular. Se midieron los niveles intracelulares de prolina antes (Control -Pro) y después de incubar durante 1 hora los parásitos Tc069 en presencia de 10 mM prolina (Control +Pro) y con la adición de cada uno de los análogos de prolina (+Pro +ITP-1B/C/D/G).

Este resultado sugiere que el análogo ITP-1G estaría bloqueando el transportador de prolina TcAAAP069 ya que el tratamiento con este compuesto no permitió el ingreso de prolina en concentraciones 250 veces menores que la prolina misma.

#### 4.5 Efecto tripanocida

A continuación, se evaluó la actividad tripanocida de los cuatro análogos en parásitos Tc069 y se comparó con parásitos control (TcGFP). Si bien ya se sabe que los compuestos presentan actividad tripanocida, mediante estos ensayos de inhibición del crecimiento se estudió la posibilidad de que los análogos ingresen al parásito a través del transportador de prolina TcAAAP069. Las  $IC_{50}$ s fueron calculadas a las 48 hs post-tratamiento porque fue el menor tiempo donde se observó el mayor efecto.

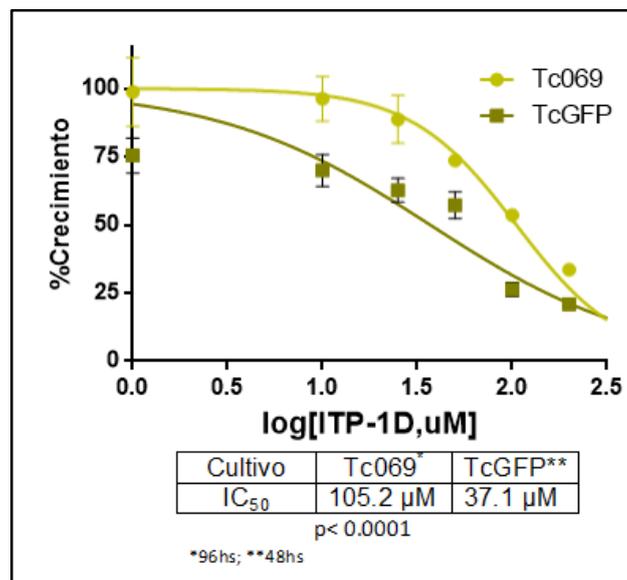
El análogo ITP-1B no presentó diferencias en la actividad tripanocida entre los distintos cultivos, las IC<sub>50</sub>s calculadas fueron 40.5 μM (±1.1) y 34.3 μM (±1.1), para los parásitos Tc069 y TcGFP respectivamente (Figura 54). Este resultado sugiere que el efecto tripanocida no se encuentra incrementado por la sobre-expresión del transportador de prolina y por lo tanto no estaría ingresando a través de la permeasa TcAAP069.



**Figura 54.** Actividad tripanocida del análogo ITP-1B en parásitos TcGFP y Tc069 de la cepa Y.

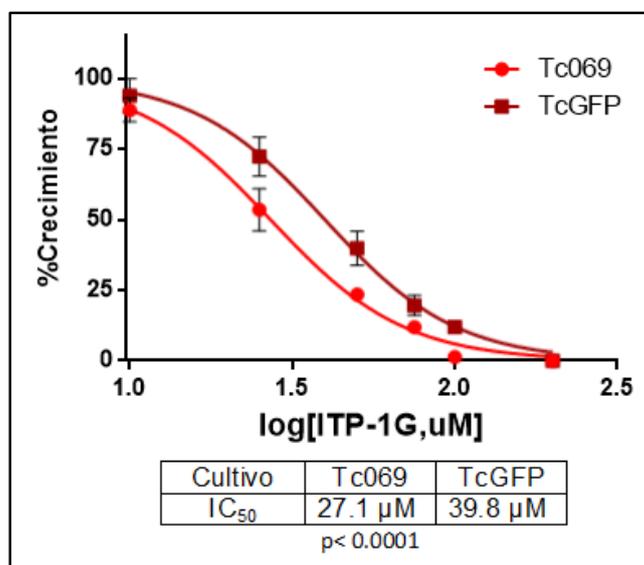
Respecto al análogo ITP-1C, no se observó efecto tripanocida sobre los cultivos de parásitos TcGFP y Tc069 en el rango 0-400 μM y durante 5 días.

En los tratamientos con el análogo ITP-1D se observó que los parásitos Tc069 presentaron un aumento significativo en la resistencia a este compuesto, de hecho los valores de inhibición del crecimiento no fueron significativos a las 48 hs, y la IC<sub>50</sub> pudo ser determinada recién al día 4 (96 hs post-tratamiento). Las IC<sub>50</sub>s para los parásitos Tc069 y TcGFP fueron 105.2 μM (±1.1) y 37.1 μM (±1.2) respectivamente (Figura 55).



**Figura 55.** Actividad tripanocida del análogo ITP-1D en parásitos TcGFP y Tc069 de la cepa Y.

En los tratamientos con el análogo ITP-1G se obtuvo una  $IC_{50}$  significativamente menor para los parásitos Tc069, con  $IC_{50}$ s calculadas de  $27.1\mu M (\pm 1.0)$  y  $39.9\mu M (\pm 1.0)$  para los parásitos Tc069 y TcGFP respectivamente (Figura 56).



**Figura 56.** Actividad tripanocida del análogo ITP-1G en parásitos TcGFP y Tc069 de la cepa Y.

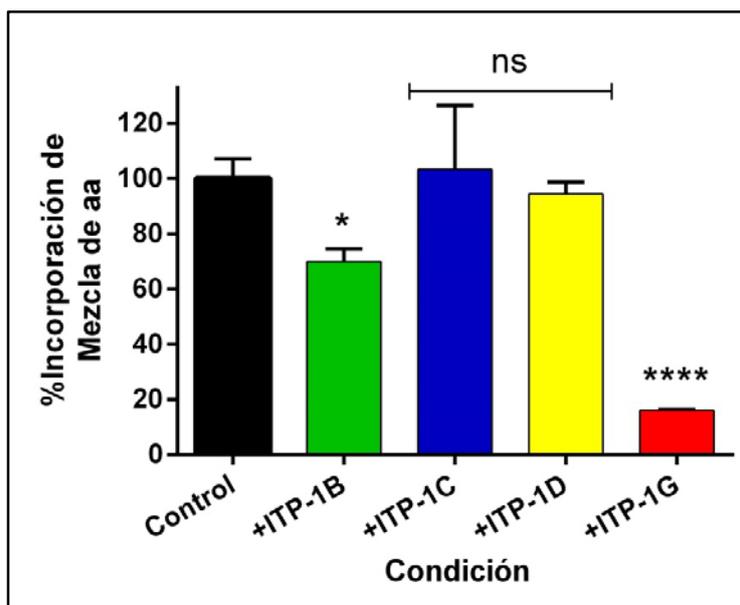
Los resultados obtenidos parecerían indicar que el análogo ITP-1G es el único que ejerce su actividad tripanocida actuando, al menos en parte, a través del transportador de prolina TcAAAP069.

#### **4.6 Inhibición de otros transportes**

A fin de evaluar si los análogos de prolina podrían ejercer su efecto tripanocida ingresando por otro transportador de aminoácidos u otros transportadores no relacionados, se evaluó la incorporación de otros metabolitos en presencia y ausencia de los análogos.

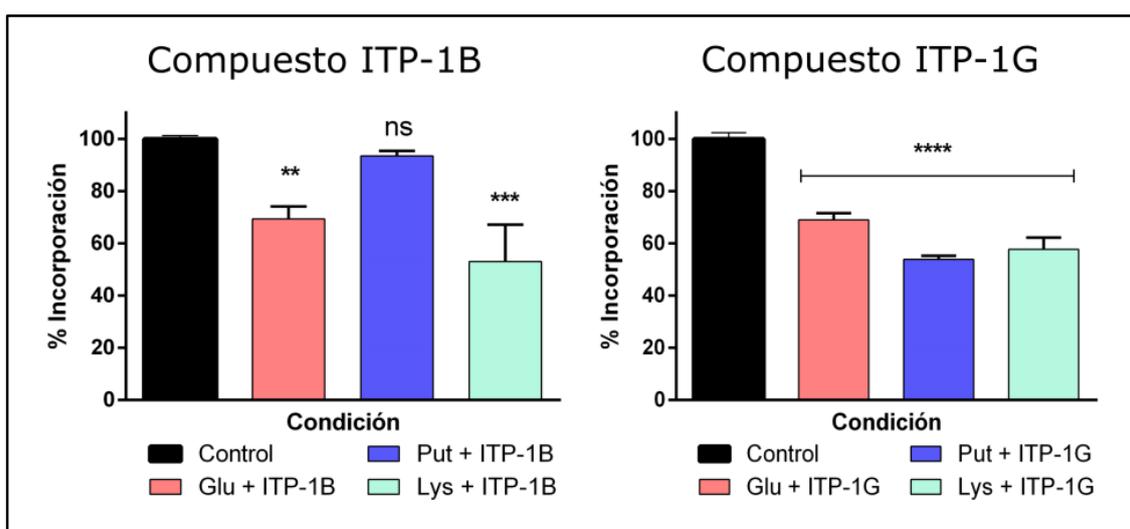
Por un lado se utilizó una mezcla de aminoácidos conteniendo alanina, arginina, aspartato, glutamato, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina y valina (Figura 57).

Los resultados muestran que los únicos análogos que disminuyeron significativamente el transporte de la mezcla de aminoácidos, por disminución en la incorporación de uno o más de sus componentes, fueron los compuestos ITP-1B e ITP-1G.



**Figura 57.** Inhibición del transporte de una mezcla de aminoácidos con los análogos de prolina en parásitos Tc069 de la cepa Y.

Dado que la mezcla de aminoácidos contiene prolina entre sus componentes, se procedió a evaluar la capacidad de los análogos ITP-1B y -1G para inhibir el transporte de otros aminoácidos (glutamato y lisina), e incluso se testeó el transporte de putrescina; estos transportes son mediados por las permeasas TcAAAP649, TcAAP7 (TcAAAP545) y TcPAT12, respectivamente, todas ellas pertenecientes a la familia TcAAAP (datos de nuestro laboratorio no publicados, Inbar et al. 2012; Reigada et al. 2016). De este modo se analizó si la disminución en la incorporación de la mezcla de aminoácidos podría deberse a la inhibición ejercida sobre el transporte de prolina o si los compuestos estarían actuando sobre otros transportadores de la familia TcAAAP (Figura 58).

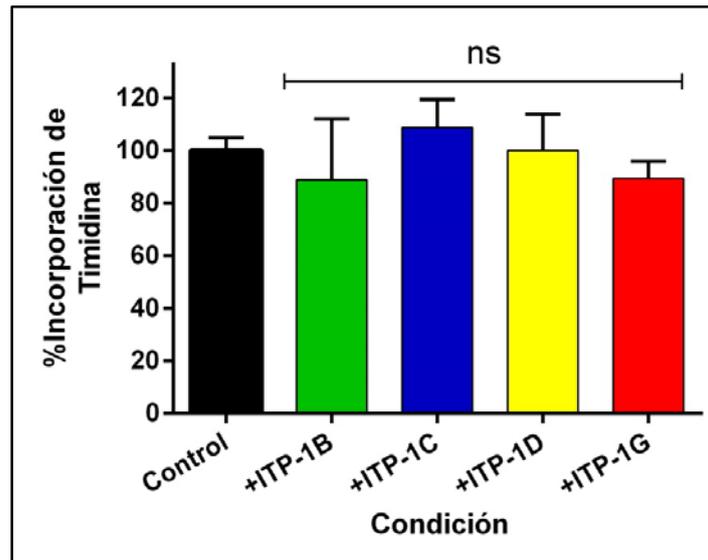


**Figura 58.** Inhibición del transporte de glutamato, putrescina y lisina con los análogos de prolina ITP-1B y 1-G en parásitos Tc069 de la cepa Y.



El compuesto ITP-1G inhibió significativamente los tres transportes ensayados, mientras que el análogo ITP-1B inhibió los transportes de glutamato y lisina, pero no el de putrescina.

Por último se estudió la inhibición del transporte de timidina, que es llevado a cabo por el transportador TcNT1 (De Koning et al. 2005), una permeasa cuya estructura no está relacionada con los transportadores de aminoácidos y derivados de la familia TcAAAP (Figura 59).



**Figura 59.** Inhibición del transporte de timidina con los análogos de prolina en parásitos Tc069 de la cepa Y.

Ninguno de los análogos de prolina produjo una disminución significativa en la incorporación de timidina, reforzando la hipótesis de que su ingreso se daría sólo a través de permeasas pertenecientes a la familia TcAAAP.

# Discusión

---

El parásito *Trypanosoma cruzi* posee un ciclo de vida complejo, que ocurre en una variedad de ambientes de diferentes composiciones, principalmente en el tracto digestivo del insecto vector, y en la sangre y el citoplasma celular del hospedador mamífero. Estos ambientes implican condiciones nutricionales y ambientales variables a lo largo de los distintos estadios del parásito. Dentro de las adaptaciones evolutivas que *T. cruzi* desarrolló se encuentran los procesos de transporte, que son rápidos y eficientes en comparación con las rutas biosintéticas. Los transportadores están en contacto con el medio extracelular y funcionan no sólo como permeasas que permiten el ingreso de metabolitos a la célula sino también como sensores ambientales (Busch & Saier 2002).

Además de considerar que el transporte es el primer paso de una ruta metabólica, se ha demostrado que los transportadores pueden facilitar la entrada a potenciales drogas tripanocidas (Hasne & Barrett 2000). Es el caso del melarsoprol, una de las drogas utilizadas para el tratamiento de la Tripanosomiasis Africana Humana (HAT, por sus siglas en inglés *Human African Trypanosomiasis*) causada por el tripanosomátido *Trypanosoma brucei*. El melarsoprol ingresa al parásito mediante el transportador de aminopurinas TbAT1 (P2), que fue identificado como vía de ingreso de esta droga a principios de la década de los '90 cuando se observó que los parásitos resistentes al tratamiento con melarsoprol carecían de dicho transportador (Carter & Fairlamb 1993). Otra identificación molecular de transportadores relacionados con el ingreso de drogas tripanocidas en *T. brucei* corresponde a la permeasa de aminoácidos neutros TbAAT6. El gen que codifica al transportador TbAAT6 corresponde al gen ortólogo no sinténico del TcAAAP069. La pérdida de la permeasa TbAAT6 da como resultado parásitos resistentes al tratamiento de HAT con eflornitina (Vincent et al. 2010; Mathieu et al. 2014). En el caso de *Leishmania major*, la acuaporina LmAQP1 media la captación de la droga estibogluconato. La sobre-expresión de dicha acuaporina produce un aumento de sensibilidad al tratamiento con compuestos antimoniales y arsenicales, y su delección induce la resistencia a estos tratamientos (Gourbal et al. 2004). Incluso recientemente se ha demostrado que los transportadores de arginina TbAAT5-3 y de lisina TbAAT16-1 de *T. brucei* son esenciales para la supervivencia del parásito (Mathieu et al. 2017). Considerando los antecedentes mencionados, la caracterización de las proteínas implicadas en los procesos de transporte de aminoácidos en *T. cruzi* resulta necesaria para comprender mejor el complejo metabolismo de los aminoácidos y el posible rol de los transportadores para el desarrollo de drogas con acción tripanocida.

## ***Propiedades del transportador de prolina TcAAAP069***

En esta tesis se decidió estudiar el transporte de prolina en el parásito *T. cruzi* dado que este aminoácido participa en variados procesos biológicos, algunos vitales para la supervivencia del parásito ante situaciones adversas y otros esenciales para el establecimiento de la infección en el hospedador mamífero. El transporte de metabolitos representa el primer paso en muchas rutas metabólicas y puede incluso regular dichos procesos. Conocer las moléculas involucradas en el transporte de prolina así como los componentes de su regulación es necesario para poder explotarlos en el desarrollo de nuevos tratamientos contra la enfermedad de Chagas.

El transportador de prolina TcAAAP069 descrito y caracterizado durante este proyecto doctoral pertenece a la más numerosa, y probablemente la única, familia de transportadores de aminoácidos y derivados en tripanosomátidos, llamada TcAAAP. Esta familia está formada al menos por 36 genes que codifican para proteínas de entre 400 y 600 aminoácidos, y que presentan entre 9 y 12 pasos transmembrana (Bouvier et al. 2004). Dos características de estas proteínas las convierten en blancos de estudio de interés no sólo biológico sino también terapéutico. Por un lado, en su condición de proteínas transportadoras median el ingreso de metabolitos, algunos esenciales como las poliaminas y por lo tanto la anulación de su función podría traducirse en la pérdida de viabilidad del parásito. Por otro lado, la falta de homología con proteínas de mamíferos las señala como potenciales vías de ingreso dirigido al parásito además de blancos de drogas *per se*.

En *T. cruzi* se han caracterizado bioquímicamente dos sistemas de transporte de prolina, uno de alta y uno de baja afinidad (Silber et al. 2002). El sistema A, de alta afinidad, presenta una constante  $K_m = 0.31 \text{ mM}$ , mientras que el sistema B posee una  $K_m = 1.36 \text{ mM}$ , siendo éste entonces el de baja afinidad. Si bien algunos aminoácidos compiten con el transporte de prolina, el sistema B es más específico que el sistema A, el cual puede ser inhibido en más del 50% por varios aminoácidos, como la metionina y la leucina entre otros. El triptófano es un claro ejemplo de diferencias en la especificidad de estos sistemas, mientras el sistema A presenta más del 70% de inhibición en el transporte de prolina en presencia de este aminoácido, no se observan cambios en el transporte mediado por el sistema B (Silber et al. 2002). Los parámetros cinéticos observados para el transportador TcAAAP069 parecerían indicar que la permeasa es similar en su afinidad al sistema A ( $K_{m\text{aparente}} = 0.33 \text{ mM}$  en la cepa MJL y  $K_{m\text{aparente}} = 0.29 \text{ mM}$  en la cepa Y, comparado con  $K_m = 0.31 \text{ mM}$  en el trabajo de Silber et al. 2002), sin embargo su elevada especificidad de sustrato es similar al sistema B. En principio, estos datos parecerían indicar la posibilidad de que exista en *T. cruzi* un sistema de transporte dual, con diferentes propiedades de acuerdo a las condiciones extracelulares, pero mediado por el mismo transportador. De todos modos, el sistema B sí es inhibido por algunos aminoácidos, como cisteína, alanina y valina, y nuestros resultados no mostraron inhibición del transporte mediado por TcAAAP069 en presencia de ningún

aminoácido en las condiciones ensayadas, ni en levaduras ni en parásitos. Esta elevada especificidad de sustrato diferencia la permeasa TcAAAP069 de sus homólogos en *Leishmania donovani* (LdAAP24) y *Trypanosoma brucei* (TbAAT6). En el caso de la permeasa LdAAP24 se demostró que transporta tanto prolina como alanina (Inbar et al. 2013); y si bien la permeasa TbAAT6 fue descubierta originalmente por mediar el ingreso de la droga eflornitina, luego se la identificó como una permeasa de baja selectividad para aminoácidos neutros, entre ellos la prolina (Vincent et al. 2010; Mathieu et al. 2014).

Otra diferencia importante y a la vez interesante, es que los sistemas caracterizados por Silber et al. no son inhibidos en presencia del estereoisómero D-prolina, y la permeasa TcAAAP069 pareciera ser estéreo-inespecífica, ya que este isómero fue capaz de disminuir significativamente la incorporación de L-prolina con una cinética de inhibición competitiva. Si bien no es frecuente, es posible que los inhibidores competitivos de un transporte no sean transportados por el sistema que inhiben (López-Burillo et al. 1985; Van Winkle et al. 1990; Thomas & Christensen 1970); sin embargo, la existencia de prolina racemasas y péptidos con D-aminoácidos en *T. cruzi* sugieren que el transporte de D-prolina podría ocurrir, y por tanto la permeasa TcAAAP069 podría ser capaz de transportar tanto L- como D-prolina. El parásito *T. cruzi* posee dos genes parálogos que codifican para prolina racemasas, de las cuales una de las isoformas es secretada al medio extracelular y la otra actúa dentro de la célula (Chamond et al. 2003). Por un lado, podría ser que el parásito convierta en D-prolina la L-prolina que encuentra en el medio extracelular y al poder adquirirla con el transportador TcAAAP069 se asegura la disponibilidad de este metabolito, el cual en caso de necesidad será reconvertido a L-prolina por la prolina racemasa citoplasmática. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de D-prolina en péptidos de *T. cruzi* y se ha postulado que podrían contribuir a la falta de especificidad inicial en la respuesta de los linfocitos B y que también podrían mejorar la resistencia del parásito a las proteasas celulares y extracelulares del hospedador (Coatnoan et al. 2009). Incluso se ha reportado que la adición de un único D-aminoácido en el extremo N-terminal de una proteína es suficiente para conferir resistencia general a enzimas proteolíticas (Janeway & Sela 1967; Janeway & Humphrey 1968). El metabolismo de la D-prolina como tal es improbable, ya que se ha demostrado que la prolina deshidrogenasa de *T. cruzi* (TcPRODH), primera enzima involucrada en la conversión de prolina a glutamato, no tiene como sustrato a este estéreo-isómero (Paes et al. 2013).

Sólo unos pocos miembros de la familia TcAAAP han sido caracterizados hasta la fecha: un transportador de lisina (TcAAAP545/TcAAP7), uno de arginina (TcAAAP411/TcAAP3) y uno de poliaminas (TcPAT12). Las tres permeasas presentan elevada especificidad para los sustratos que transportan, y cabe destacar en particular que las permeasas de lisina y arginina son mono-específicas, a diferencia de la mayoría de los transportadores en mamíferos que transportan grupos de aminoácidos (Inbar et

al. 2012; Miranda et al. 2012). En concordancia con esta información, el transportador TcAAAP069 también presentó elevada especificidad para su sustrato prolina. Además, todas las permeasas caracterizadas de la familia TcAAAP han sido localizadas en una zona cercana al bolsillo flagelar, donde también fue ubicada la permeasa de prolina (Hasne et al. 2010; Inbar et al. 2012; Miranda et al. 2012). La presencia de los cuatro transportadores caracterizados en esta región refuerza la hipótesis de que todos los miembros de la familia TcAAAP se encuentran localizados en la zona del bolsillo flagelar. Interesantemente, la permeasa de prolina también se observó localizada a lo largo de la membrana plasmática, y de hecho, la mayor actividad del transportador se correlacionó con su presencia tanto en la membrana como en la región cercana al bolsillo flagelar. La presencia en membrana plasmática constituye el primer reporte de un miembro de la familia TcAAAP con esta localización subcelular.

### ***Prolina y estrés***

Durante su ciclo de vida el parásito *T. cruzi* se encuentra expuesto a diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) generadas por el metabolismo aeróbico del parásito, la respuesta inmune del hospedador mamífero y ocasionalmente por las drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Turrens 2004). Las ROS pueden provocar disrupciones en membranas, inactivación de enzimas, mutagénesis y daños en la maquinaria de reparación del ADN.

Los parásitos protozoarios presentan grandes diferencias en sus defensas antioxidantes, no sólo al compararlos con sus hospedadores mamíferos sino también entre ellos. Por ejemplo, los tripanosomátidos y *Plasmodium* spp. poseen una isoforma de la superóxido dismutasa (SOD), normalmente presente sólo en bacterias y ausente en células eucariotas (Bécuwe et al. 1996; Turrens & McCord 2006). Además, no se ha encontrado la enzima catalasa en ninguno de estos parásitos, aunque sí se ha reportado actividad catalasa en *Toxoplasma gondii* (Boveris et al. 1980; Kwok et al. 2003). Y si bien *Plasmodium* spp. posee un sistema antioxidante dependiente de glutatión, éste no se ha encontrado en los tripanosomátidos (Flohé et al. 1999; Boveris et al. 1980). *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp. sintetizan tripanotión, un ditiol derivado de glutatión único en estos parásitos, que les permite eliminar el peróxido de hidrógeno y cuyo metabolismo ha sido propuesto como un potencial blanco terapéutico (Fairlamb & Cerami 1992; Flohé et al. 1999; Steenkamp 2002; Krauth-Siegel et al. 2003). La SOD y el tripanotión son sólo algunos de los mecanismos antioxidantes que poseen estos parásitos.

Además del rol energético y de participar en la biosíntesis de proteínas, se ha reportado que la prolina contribuye en la protección contra estreses oxidativo y térmico en hongos, bacterias, plantas y células de mamífero (Chen & Dickman 2005; Chen et al. 2006; Kaino & Takagi 2008; Grothe et al. 1986; Krishnan & Becker 2006; Zhang et al.

2015; Verbruggen & Hermans 2008; Verslues & Sharma 2010; Anwar Hossain et al. 2014; Krishnan et al. 2008; Natarajan et al. 2012). Adicionalmente hay evidencias de que la prolina actúa *in vitro* como *scavenger* de radicales libres (Alia et al. 2001; Kaul et al. 2008). En *T. cruzi*, se ha reportado que al interferir en el metabolismo de prolina con el análogo T4C se obtienen parásitos más susceptibles al estrés oxidativo (Magdaleno et al. 2009). También se ha demostrado que la sobre-expresión de la enzima TcPRODH en levaduras resulta en células más sensibles al estrés oxidativo como resultado de la disminución de los niveles de prolina intracelular (Paes et al. 2013).

Una mayor velocidad de transporte no necesariamente implica una mayor acumulación del metabolito dentro del parásito, ya que pueden existir mecanismos que compensen el ingreso del mismo. En el caso del transportador TcAAP069 observamos que los parásitos que sobre-expresan dicha permeasa (parásitos Tc069) presentan no sólo mayores velocidades de incorporación de prolina sino también una mayor concentración intracelular del aminoácido. La prolina puede ser convertida a glutamato a través de la acción de dos enzimas y un paso no enzimático. El glutamato obtenido puede ser convertido en intermediarios del ciclo de Krebs, además de FADH<sub>2</sub> y NAD(P)H. De hecho, se ha demostrado que tripomastigotes metacíclicos cuyos niveles de ATP fueron disminuidos por ayuno prolongado recuperan los niveles de ATP y su capacidad infectiva al ser incubados con prolina (Martins et al. 2009). También se ha reportado que luego del agotamiento de la glucosa en el medio, el parásito utiliza aminoácidos, prolina entre ellos, como fuente de carbono y energía (Cazzulo 1994). Así queda evidenciada la contribución de la prolina al balance energético del parásito, y efectivamente los parásitos Tc069 además de tener mayor concentración de prolina presentaron mayores niveles de ATP intracelular. En cuanto al transporte de glutamato, éste no se vio afectado por la acumulación de prolina; esto podría indicar que o bien la prolina no estaría siendo convertida a glutamato, o bien el glutamato generado a partir de la prolina estaría siendo metabolizado a fin de mantener constante el nivel de glutamato intracelular, o también podría ser una combinación de ambas.

Además de presentar mayor concentración intracelular de prolina, los parásitos Tc069 demostraron ser más resistentes al ser sometidos tanto a estrés nitrosativo como oxidativo. Ambos escenarios son de especial interés en la biología del parásito *T. cruzi*. Al comienzo de la infección en el hospedador humano, los macrófagos producen óxido nítrico a través de la iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) a fin de eliminar a los tripomastigotes (Costa et al. 2006). Además una vez dentro de las células del hospedador vertebrado, la vacuola parasitófora se fusiona con los lisosomas, originando el fagolisosoma. En este compartimento, el parásito depende de una compleja red de enzimas antioxidantes para protegerse de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno lisosomales (Piacenza et al. 2008). Estas son situaciones fisiológicas con las que el parásito *T. cruzi* se enfrenta a lo largo de su ciclo de vida. Por otro lado, el mecanismo de acción de las drogas utilizadas para tratar la enfermedad de Chagas involucra, al

menos en parte la generación de estrés oxidativo (Hall & Wilkinson 2012; Hall et al. 2011; Rajão et al. 2014). En concordancia con todos estos datos, los parásitos Tc069 demostraron ser más resistentes al estrés oxidativo, nitrosativo y a los tratamientos con nifurtimox y con benznidazol.

También se ha postulado que el parásito precisa señales de ROS para proseguir con la infección dentro de las células del hospedador mamífero (Goes et al. 2016). Esto podría explicar por qué en resultados preliminares, que no se han mencionado en la sección de Resultados, hemos observado un menor grado de parasitemia en ratones infectados con tripomastigotes Tc069 comparado con tripomastigotes TcGFP o *wild-type*. Pareciera ser que la resistencia aumentada al estrés oxidativo interfiere con el establecimiento de la infección, pero esta hipótesis debe ser estudiada con mayor profundidad.

### ***Regulación del transportador de prolina TcAAAP069***

Como consecuencia de la transcripción policistrónica y la falta de promotores típicos para la ARN Pol II, la expresión de la mayoría de los genes en tripanosomátidos está regulada post-transcripcionalmente. Las variaciones observadas en el nivel de expresión de una proteína deben ser resultado de cambios en la estabilidad de los ARNm, en la traducción o en la estabilidad de la proteína. Las secuencias regulatorias que se encuentran presentes en las regiones no traducibles (UTR) de los distintos genes, principalmente en los 3' UTRs, actúan como sitios de unión a proteínas (RBP, *RNA Binding Proteins*) que afectan la estabilidad de los ARNm, y resultan elementos clave en la modulación de los niveles individuales de ARNm durante el ciclo de vida del parásito (De Gaudenzi et al. 2003).

La sobre-expresión del transportador de prolina TcAAAP069 con un vector de expresión como el pTREX, descarta la regulación post-transcripcional de la proteína en los parásitos Tc069 dado que en el vector sólo se clona la secuencia codificante del gen, y las regiones 5'- y 3' UTR corresponden a los genes GAPDH. Así, queda en evidencia que las variaciones reportadas para la actividad, expresión y localización de la permeasa de prolina TcAAAP069 son consecuencia principalmente de modificaciones post-traduccionales. De hecho, este transportador posee por predicciones bioinformáticas 5 posibles sitios de fosforilación además de varios sitios de SUMOilación (Marchini et al. 2011). Interesantemente, todos estos posibles sitios de regulación post-traduccionales se encuentran en el extremo N-terminal de la permeasa que, como fue mencionado previamente, es la región de los miembros de la familia TcAAAP con menor porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica. Con respecto al rol del extremo N-terminal, en *Leishmania donovani* se sabe que los primeros 18 aminoácidos (aa) del transportador bi-específico de alanina/prolina codificado por el gen LdAAP24, homólogo del TcAAAP069, son los que determinan la especificidad por la alanina, mientras que la remoción de los primeros 54 aa ocasiona también la pérdida de la capacidad para



transportar prolina (Schlüsselberg et al. 2015). El estudio del rol del extremo N-terminal en la permeasa de prolina TcAAP069 se abordará como continuación de esta tesis doctoral.

La acumulación de prolina libre depende no sólo de su captación del medio extracelular sino también de su biosíntesis y degradación. Por este motivo, los cambios observados en la concentración intracelular de prolina podrían no deberse exclusivamente a las variaciones del transporte, y probablemente esto explique por qué el nivel máximo de prolina intracelular se obtuvo desfasado con la velocidad máxima de transporte. Nuestros resultados demuestran que el transporte de prolina en epimastigotes varía durante el crecimiento del cultivo, desde velocidades indetectables al comienzo del repique, pasando por un pico máximo al inicio de la fase exponencial de crecimiento y luego volviendo a ser indetectable en la fase estacionaria. Los epimastigotes consumen principalmente L-prolina por su elevada disponibilidad en la hemolinfa e intestino del insecto vector, sin embargo, en cultivo consumen glucosa hasta agotarla y luego recién comienzan a utilizar aminoácidos como fuente de carbono y energía (Cazzulo 1994). Nuestros resultados indican que la prolina es acumulada por los epimastigotes en cultivo antes de ingresar en la fase exponencial durante la curva de crecimiento y esto sugiere que la prolina es necesaria para el crecimiento en cultivo de los epimastigotes, como lo es en el ciclo de vida dentro de la vinchuca. Asimismo, el transporte de prolina también varía entre los diferentes estadios intracelulares del parásito *T. cruzi*, y si bien se demostró que los epimastigotes intracelulares son los que poseen la mayor actividad en el transporte de prolina, también son los que presentan los niveles intracelulares más bajos de dicho aminoácido (Tonelli et al. 2004). Esto no sorprende, ya que, como fue mencionado anteriormente, la prolina es un aminoácido esencial para el progreso del ciclo de vida de epimastigote intracelular a tripomastigote y aquí la prolina cumple un rol principalmente energético (Martins et al. 2009). En nuestro caso vimos que los epimastigotes de cultivo también poseen una elevada actividad en el transporte de prolina, la cual disminuye gradualmente hasta que los parásitos alcanzan la fase exponencial tardía, y ya en fase estacionaria no se detecta transporte de prolina mediado por la permeasa TcAAP069, cuando los epimastigotes están en transición a tripomastigotes metacíclicos. En el medio de cultivo, hay aproximadamente 5 mM de prolina, y en las células de mamífero la concentración de este aminoácido es de 0.3 mM (Silber et al. 2009). En uno de los insectos vector de *T. cruzi*, *Rhodnius prolixus*, se han reportado, para 3 colonias diferentes y 7 días después de alimentarse, concentraciones de prolina entre 3.8 y 22.4 mM (Harrington 1961). Las diferencias en la disponibilidad de prolina en estos distintos ambientes podrían explicar por qué los epimastigotes de cultivo poseen niveles mayores de prolina que los epimastigotes intracelulares.

Los efectos regulatorios del medio condicionado en epimastigotes de *T. cruzi* han sido reportados previamente, e incluyen procesos variados como división celular,

metacicloogénesis, expresión de la arginina quinasa, transporte de arginina, aspartato, cisteína y lisina, actividad de la adenilato quinasa soluble, y localización de la adenilato quinasa nuclear (Alonso et al. 2001; Bouvier et al. 2006; M. de los M. Cámara et al. 2013; Canepa et al. 2005; Canepa et al. 2009; M. D. L. M. Cámara et al. 2013; Inbar et al. 2012; Pereira et al. 2002). Los experimentos realizados con medio condicionado o bien, aumentando artificialmente la densidad del cultivo, sugieren la existencia de un factor aún desconocido asociado a la densidad y que pareciera influir en el metabolismo del parásito. Este factor sería extracelular ya que estaría presente tanto en el medio de cultivo de parásitos en fase estacionaria tardía, como en cultivos de parásitos concentrados artificialmente. Nuestra hipótesis es que pareciera que al alcanzarse un umbral de densidad de cultivo, los parásitos secretan dicho factor a fin de regular poblacionalmente ciertos procesos, entre ellos el transporte de prolina. De hecho, en *T. brucei* la diferenciación de la forma esbelta (*slender*) a la forma corta (*stumpy*) es una respuesta dependiente de la densidad que recuerda al *quórum sensing* en bacterias (Mony et al. 2014). En el caso de *T. cruzi*, el análisis proteómico del secretoma demostró que las vesículas extracelulares de este parásito muestran un enriquecimiento de proteínas implicadas en interacciones parásito-huésped, inmunomodulación y señalización celular (Bayer-Santos et al. 2013).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos proponemos un modelo para la regulación del transportador de prolina TcAAAP069. Al inicio del cultivo, no se detecta incorporación de prolina en los parásitos, probablemente por falta del transportador. A medida que se replican, la permeasa de prolina se expresa y localiza no sólo a lo largo de la membrana plasmática sino además en el bolsillo flagelar, y su actividad aumenta hasta un máximo que coincide con el inicio de la fase exponencial. A medida que el cultivo progresa, los parásitos disminuyen la incorporación de prolina y la permeasa es degradada hasta alcanzar niveles indetectables cuando el cultivo se satura. La variación en la actividad y localización no depende de la concentración extracelular de prolina e hipotetizamos que podría estar relacionada con un factor de naturaleza desconocida dependiente de la densidad del cultivo.

### ***Análogos de prolina***

El uso de análogos de metabolitos ha sido ampliamente explorado, principalmente como inhibidores reversibles o irreversibles de rutas metabólicas. La eflornitina, un análogo de ornitina, es una de las drogas actualmente utilizada en el tratamiento de la HAT. La eflornitina tiene como blanco de acción a la enzima ornitina decarboxilasa (ODC), por lo tanto causa una disminución en la biosíntesis de poliaminas y reduce la producción de tripanotión, un compuesto único en tripanosomátidos involucrado en la protección contra el estrés oxidativo (Bacchi et al. 1983; Krauth-Siegel et al. 2005).

El análogo de prolina T4C disminuye la viabilidad de los epimastigotes de *T. cruzi* y afecta la resistencia a estrés nutricional y estrés oxidativo, además de interferir con el

metabolismo de prolina y la eclosión de los tripomastigotes (Magdaleno et al. 2009). A pesar de estos resultados, el compuesto T4C presenta elevados valores de IC<sub>50</sub> (entre 0.5-0.9 mM) por lo que queda descartado como candidato a droga por sí mismo, aunque bien podría ser modificado o evaluado en combinación con las drogas actuales en busca de un efecto sinérgico. En este trabajo de tesis, los ensayos de transporte de prolina realizados en presencia de este análogo mostraron una disminución del 44.2% en el ingreso del aminoácido.

En cuanto al desarrollo de moléculas quiméricas, se han evaluado algunos conjugados de aminoácidos como inhibidores de la dUTPasa de *T. cruzi*, aunque los resultados fueron insatisfactorios, ya que ninguno de los compuestos desarrollados logró inhibir la enzima, incluso en concentraciones elevadas como 1 mM (Mc Carthy et al. 2006). Recientemente han sido evaluados en *T. brucei* y *Leishmania donovani* conjugados de poliaminas como potenciales inhibidores de la tripanotión reductasa, y si bien uno de ellos fue capaz de inhibir la actividad de la enzima recombinante, no presentó efecto tripanocida significativo (Jagu et al. 2016).

También se han intentado diseñar drogas cuyo ingreso sea dirigido dentro del parásito. Se sabe que el motivo melamínico presente en el melarsoprol, otra droga usada para tratar la HAT, es el responsable de su ingreso a través del transportador de aminopurinas TbAT1 (P2). Muchos compuestos se han sintetizado y testeado en el parásito *T. brucei* haciendo uso de este motivo con diferentes agentes tripanocidas, como análogos de poliaminas, nitroheterociclos, fluoroquinolonas, artesunatos e incluso eflornitina (Tye et al. 1998; Klenke et al. 2001; Baliani et al. 2005; Baliani et al. 2009; Chollet et al. 2009). Los resultados más prometedores fueron obtenidos con los conjugados con nitroheterociclos, y si bien se obtuvo un compuesto con actividad *in vitro* comparable a la del melarsoprol capaz de curar la enfermedad aguda en un modelo murino, las propiedades farmacológicas y genotxicológicas no fueron las esperadas (Giordani et al. 2014).

Además se han diseñado conjugados de distintas quinonas con aminoácidos y con poliaminas. Los conjugados con aminoácidos ensayados en el parásito *Leishmania donovani*, si bien resultaron menos efectivos que las quinonas por sí mismas, mostraron menor toxicidad hacia las células hospedadoras y fueron capaces de inhibir el transporte de los respectivos aminoácidos demostrando que los transportadores de aminoácidos pueden ser explotados para el *delivery* de drogas (Prati et al. 2014). En cuanto a los conjugados con poliaminas, fueron probados en los tres tripanosomátidos, y al igual que con los conjugados con aminoácidos, todos resultaron menos efectivos que las quinonas sin conjugar, aunque algunos resultaron buenos inhibidores de la tripanotión reductasa (Lizzi et al. 2012).

Los análogos diseñados en el Instituto de Química Rosario por el grupo del Dr. Labadié se sintetizaron con un anillo triazólico en su estructura porque los azoles

constituyen un conjunto de fármacos fungistáticos frecuentemente utilizados en el tratamiento de candidiasis y otras micosis, y hay numerosos reportes de antifúngicos con actividad tripanocida (Avila et al. 1981; McCabe et al. 1986; Goad et al. 1989). De hecho, el antifúngico de amplio espectro posaconazol es un fármaco triazólico con actividad tripanocida *in vitro* e *in vivo* que recientemente ha sido evaluado en ensayos clínicos con eficacia limitada en pacientes con enfermedad de Chagas (Molina et al. 2000; Molina et al. 2014). En este trabajo se estudiaron aquellos análogos de prolina que presentaron efecto tripanocida en epimastigotes de la cepa CL14 (DTU TcVI) con valores de IC<sub>50</sub> debajo de los 50  $\mu$ M y baja toxicidad en células de mamífero.

Se utilizaron los análogos de prolina ITP-1B, ITP-1C, ITP-1D e ITP-1G y se ensayó su capacidad de afectar el transporte de prolina mediado por la permeasa TcAAAP069 a fin de estudiar si el efecto tripanocida observado podría estar relacionado con el transporte de dicho aminoácido. Los resultados obtenidos demuestran que es posible diseñar análogos de prolina con actividad tripanocida en rangos terapéuticos (entre 30 y 40  $\mu$ M para los parásitos control) similares a los que se obtienen en cepas de distintos DTUs para el benznidazol (entre 7 y 30  $\mu$ M) (Moreno et al. 2010). Sólo dos de los compuestos ensayados inhibieron el transporte de prolina mediado por el transportador TcAAAP069. El análogo ITP-1G pareció actuar como bloqueador de la permeasa, ya que la adición de 40  $\mu$ M del compuesto en presencia de 10 mM de prolina no permitió el aumento de los niveles intracelulares de dicho aminoácido y además fue capaz de inhibir en un 51% el transporte de prolina. Por su parte, el compuesto ITP-1B también fue capaz de inhibir el transporte, pero sólo en dosis mayores a su IC<sub>50</sub>, lo que explicaría por qué no se pudo detectar la inhibición al usar sólo 40  $\mu$ M.

Sólo los análogos ITP-1B e ITP-1G afectaron el transporte de la mezcla de aminoácidos, sugiriendo que sus efectos no están limitados exclusivamente a la permeasa de prolina TcAAAP069. Teniendo en cuenta que los miembros de la familia de transportadores de aminoácidos y derivados TcAAAP presentan una elevada identidad de secuencia aminoacídica, con excepción del extremo N-terminal, la múltiple acción de estos compuestos podría deberse a su interacción con las regiones más conservadas de los transportadores de la familia TcAAAP. Sin embargo, la falta de inhibición del análogo ITP-1B en el transporte de putrescina no resultó necesariamente llamativa, ya que la permeasa TcPAT12 y los otros posibles transportadores de poliaminas son los miembros más divergentes de la familia TcAAAP, e incluso presentan los niveles más bajos de identidad de secuencia aminoacídica aún en su extensión C-terminal (tesis del Dr. Gaspar Cánepa). Ninguno de los compuestos inhibió el transporte de timidina, reforzando la hipótesis de que su acción estaría limitada a los miembros de la familia TcAAAP.

Si bien los dos análogos mencionados inhibieron el transporte de prolina, sólo en el caso del compuesto ITP-1G esta capacidad pareciera estar relacionada con la actividad

tripanocida del compuesto, ya que los parásitos que sobre-expresan la permeasa de prolina TcAAAP069 fueron significativamente más sensibles sólo en presencia de este análogo, mientras que con el compuesto ITP-1B no se obtuvieron diferencias, indicando que su acción sobre la permeasa de prolina no se relaciona con el efecto tripanocida.

Con respecto a los compuestos ITP-1C e ITP-1D, los resultados indican que estos análogos no inhiben la actividad del transportador de prolina TcAAAP069 ni de otros miembros de la familia TcAAAP, por lo que al menos en el caso del análogo ITP-1D su acción tripanocida no estaría relacionada con el transporte de metabolitos. Sorprendentemente, el tratamiento con el compuesto ITP-1D fue significativamente menos efectivo contra los parásitos Tc069, y como su efecto tripanocida no se relaciona con el transporte mediado por la permeasa TcAAAP069, el aumento en la IC<sub>50</sub> en estos parásitos podría deberse al mecanismo de acción del análogo (por ejemplo, los parásitos Tc069 son más resistentes al estrés oxidativo, por lo que si el análogo ITP-1G genera ROS en los parásitos, los que sobre-expresan la permeasa TcAAAP069 presentarían mayor sobrevivencia). Sin embargo más estudios son necesarios a modo de confirmar o no esta hipótesis.

En cuanto al análogo ITP-1C en nuestro trabajo no pudimos corroborar el efecto tripanocida del compuesto. Esto puede deberse a las condiciones de nuestros experimentos hayan sido diferentes a las de los ensayos realizados por el grupo del Dr. Labadié. Incluso la cepa de *T. cruzi* utilizada fue distinta, y podría indicar que la acción de este compuesto difiere entre las distintas cepas del parásito.

El hecho de que el compuesto ITP-1G ejerza su actividad tripanocida ingresando al parásito no por una única vía, sino utilizando diferentes proteínas de una misma familia (multidiana) resulta interesante desde el punto de vista de la baja posibilidad de generación de resistencia. Como se mencionó anteriormente, la resistencia al melarsoprol está dada por la pérdida del transportador TbAT2, y en el caso de eflornitina por la pérdida de la permeasa TbAAT6; en el caso del análogo de prolina mencionado, es improbable la pérdida de múltiples miembros de la familia TcAAAP, por lo que su estudio podría resultar prometedor en el desarrollo de nuevas terapias contra la enfermedad de Chagas.

# Conclusiones

---

El gen TcAAAP069 codifica para una permeasa de prolina altamente específica, cuya actividad puede ser inhibida por el estéreo-isómero D-prolina, siendo esta característica particularmente interesante dado que *Trypanosoma cruzi* posee prolina racemasas y por lo tanto el transporte de D-prolina podría ocurrir a través del transportador TcAAAP069. La sobre-expresión de la permeasa permitió confirmar que mayores niveles intracelulares de prolina ejercen un efecto protector ante situaciones de estrés oxidativo y nitrosativo, incluyendo las drogas utilizadas actualmente para tratar la enfermedad de Chagas.

La expresión, actividad y localización del transportador de prolina TcAAAP069 varía durante el crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo. La expresión y actividad de la permeasa y la concentración de prolina intracelular alcanzan un máximo al inicio de la fase exponencial, y a medida que el cultivo progresa la actividad y expresión decaen gradualmente hasta niveles indetectables mientras que la prolina intracelular regresa a sus niveles iniciales. Interesantemente, además de estar presente en una región cercana al bolsillo flagelar como los otros miembros caracterizados de la familia TcAAAP, el transportador de prolina TcAAAP069 se localiza también a lo largo de la membrana plasmática cuando la actividad es máxima. Los cambios no están vinculados con la disponibilidad de sustrato, sino más bien con la densidad del cultivo.

De los cuatro análogos evaluados, sólo los compuestos denominados ITP-1B e ITP-1G inhiben el transporte de prolina y también de otros aminoácidos y/o poliaminas pero no de otros metabolitos como la timidina. Sin embargo, únicamente con el análogo ITP-1G la capacidad de inhibir el transporte está relacionada con la acción tripanocida. El estudio de los análogos de prolina demuestra que es posible diseñar análogos de aminoácidos con actividad tripanocida que utilicen como vía de ingreso los transportadores de la familia TcAAAP.

El transportador de prolina TcAAAP069 constituye un blanco terapéutico interesante no sólo por sus diferencias con los transportadores de las células del hospedador, sino también porque puede ser utilizado para vehicular compuestos tóxicos dentro del parásito. Además nuestros resultados permiten confirmar a la familia de transportadores de aminoácidos y derivados TcAAAP de *T. cruzi* como un blanco terapéutico múltiple y prometedor para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la enfermedad de Chagas.

# Bibliografía

---



- Alberts, B. et al., 2002. *Molecular Biology of the Cell*,
- Alia, Mohanty, P. & Matysik, J., 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 21(2), pp.195–200.
- Almeida-de-Faria, M. et al., 1999. Trypanosoma cruzi: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Experimental parasitology*, 92, pp.263–274.
- Alonso, G.D. et al., 2001. Arginine kinase of the flagellate protozoa Trypanosoma cruzi. Regulation of its expression and catalytic activity. *FEBS letters*, 498(1), pp.22–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11389891>.
- Anwar Hossain, M. et al., 2014. Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms. In *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*. pp. 477–522.
- Avila, J.L., Avila, A. & Munoz, E., 1981. Effect of allopurinol on different strains of Trypanosoma cruzi. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(4), pp.769–774.
- Bacchi, C.J. et al., 1983. In vivo effects of alpha-DL-difluoromethylornithine on the metabolism and morphology of Trypanosoma brucei brucei. *Molecular and biochemical parasitology*, 7(3), pp.209–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6193423>.
- Bakker, B.M. et al., 1999. Contribution of glucose transport to the control of the glycolytic flux in Trypanosoma brucei. *Biochemistry*, 96(August), pp.10098–10103.
- Bakker, B.M. et al., 2000. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 106(1), pp.1–10.
- Baliani, A. et al., 2005. Design and synthesis of a series of melamine-based nitroheterocycles with activity against trypanosomatid parasites. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(17), pp.5570–5579.
- Baliani, A. et al., 2009. Novel functionalized melamine-based nitroheterocycles: synthesis and activity against trypanosomatid parasites. *Organic & biomolecular chemistry*, 7(6), pp.1154–1166.
- Barrett, M.P. et al., 2003. The trypanosomiasis. *The Lancet*, 362(9394), pp.1469–1480.
- Barrett, M.P. et al., 1998. Trypanosome glucose transporters. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91(1), pp.195–205.
- Bates, L.S., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, pp.205–207.
- Bayer-Santos, E. et al., 2013. Proteomic analysis of trypanosoma cruzi secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of Proteome Research*, 12(2), pp.883–897.
- Bayer-Santos, E. et al., 2012. Regulatory elements in the 3' untranslated region of the GP82

- glycoprotein are responsible for its stage-specific expression in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Acta Tropica*, 123(3), pp.230–233. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.03.014>.
- Bécuwe, P. et al., 1996. Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 76(1–2), pp.125–134.
- Berriman, M. et al., 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), pp.416–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020726>.
- Birkholtz, L. et al., 2011. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa : peculiarities and possibilities. , 244, pp.229–244.
- Birnboim, H.C. & Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), pp.1513–1523.
- Bonhivers, M. et al., 2008. Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. *PLoS biology*, 6(5), p.e105. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2365980&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 24, 2011].
- Bouvier, A. et al., 2004. Post genomic analysis of permeases from the amino acid/auxin family in protozoan parasites. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321, pp.547–556.
- Bouvier, L.A. et al., 2013. Plasmid Vectors and Molecular Building Blocks for the Development of Genetic Manipulation Tools for *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 8(10), pp.1–11.
- Bouvier, L. a et al., 2006. An expanded adenylate kinase gene family in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et biophysica acta*, 1760(6), pp.913–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567051>.
- Boveris, A. et al., 1980. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical journal*, 188(3), pp.643–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1161944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Branche, C. et al., 2006. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147(1), pp.30–38.
- Bringaud, F., Riviere, L. & Coustou, V., 2006. Energy metabolism of trypanosomatids : Adaptation to available carbon sources. *Parasitology*, 149, pp.1–9.
- Busch, W. & Saier, M.H., 2002. The transporter classification (TC) system. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 37(5), pp.287–337. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12449427>.
- Cámara, M. de los M. et al., 2013. Molecular and Functional Characterization of a *Trypanosoma cruzi* Nuclear Adenylate Kinase Isoform. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2).

- Cámara, M.D.L.M. et al., 2013. Laboratory techniques to obtain different forms of *Trypanosoma cruzi*: Applications to wild-type and genetically modified parasites. *Folia Parasitologica*, 60(5), pp.406–410.
- Canale, D., Miriam, M.G. & Spillmann, C., 2009. Guía para el control vectorial de la enfermedad de Chagas. , p.37.
- Canepa, G.E. et al., 2005. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS microbiology letters*, 247(1), pp.65–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927749> [Accessed September 26, 2011].
- Canepa, G.E. et al., 2004. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters*, 236(1), pp.79–84.
- Canepa, G.E. et al., 2004. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS microbiology letters*, 236(1), pp.79–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15212794> [Accessed August 17, 2011].
- Canepa, G.E. et al., 2009. Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS microbiology letters*, 292(1), pp.27–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19175408> [Accessed August 24, 2011].
- Cannata, J.J.B. & Cazzulo, J.J., 1984. Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 11(C), pp.37–49.
- Carrillo, C. et al., 2003. Lack of arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(5), pp.312–316.
- Carrillo, C. et al., 2006. Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and biophysical research communications*, 344(3), pp.936–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631600> [Accessed October 27, 2011].
- Carrillo, C. et al., 2010. *Trypanosoma cruzi* amino acid transporter TcAAAP411 mediates arginine uptake in yeasts. *FEMS microbiology letters*, 306(2), pp.97–102. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20337715> [Accessed August 17, 2011].
- Carrillo, C. et al., 1999. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Letters*, 454(3), pp.192–196.
- Carter, N.S. & Fairlamb, A.H., 1993. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature*, 361(6408), pp.173–176.
- Cazzulo, J.J., 1992. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The FASEB journal*, 6, pp.3153–3161.
- Cazzulo, J.J., 1994. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 26(2), pp.157–165.

- Cazzulo, J.J., Juan, S.M. & Segura, E., 1977. The Malic Enzyme from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of General Microbiology*, (99), pp.237–241.
- Chamond, N. et al., 2003. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), pp.15484–15494.
- Chen, C. et al., 2006. Tomato QM-like protein protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress by regulating intracellular proline levels. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), pp.4001–4006.
- Chen, C. & Dickman, M.B., 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Pnas*, 102(9), pp.3459–3464. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/102/9/3459>.
- Chollet, C. et al., 2009. Targeted delivery of compounds to *Trypanosoma brucei* using the melamine motif. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(6), pp.2512–2523. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.058>.
- Coatnoan, N. et al., 2009. Proline racemases: Insights into *Trypanosoma cruzi* peptides containing D-proline. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), pp.295–300.
- Contreras, V.T. et al., 1985. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16(3), pp.315–327.
- Cooper, G.M. & Hausman, R.E., 2007. *The Cell: A Molecular Approach 2nd Edition*,
- Costa, V.M. a. et al., 2006. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of immunology*, 177(5), pp.3193–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920958>  
<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.5.3193>.
- Coura, J.R. et al., 2002. Control of Chagas disease. *World Health Organization - Technical Report Series*, (905), pp.1–99.
- Cribb, P. & Serra, E., 2009. One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the *Trypanosoma cruzi* spliced leader RNA gene promoter binding complex. *International Journal for Parasitology*, 39(5), pp.525–532. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.008>.
- Crocco, L., Catalá, S. & Martinez, M., 2002. Enfermedad de Chagas y sus vectores Módulo de Actualización. , pp.1–29.
- Darocha, W.D. et al., 2004. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 133(2), pp.175–186.
- Duffy, T. et al., 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(4).
- Durante, I.M., Cámara, M.D.L.M. & Buscaglia, C.A., 2015. A Novel *Trypanosoma cruzi* Protein

Associated to the Flagellar Pocket of Replicative Stages and Involved in Parasite Growth. *PLoS One*, pp.1–28.

- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., et al., 2005. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science*, 309(5733), p.404 LP-409. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/309/5733/404.abstract>.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., et al., 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), pp.409–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725>.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., et al., 2005b. *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease.*, Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725>.
- Fairlamb, a H. & Cerami, a, 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual review of microbiology*, 46, pp.695–729.
- Faucher, J.F., Baltz, T. & Petry, K.G., 1995. Detection of an “epimastigote-like” intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology research*, 81(5), pp.441–443.
- Flohé, L., Hecht, H.J. & Steinert, P., 1999. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. In *Free Radical Biology and Medicine*. pp. 966–984.
- Frydman, B. et al., 1990. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [1-13C]glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Evidence of the presence of two alanine pools and of two CO<sub>2</sub> fixation reactions. *European Journal of Biochemistry*, 192(2), pp.363–368.
- De Gaudenzi, J.G., D’Orso, I. & Frasch, A.C.C., 2003. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), pp.18884–18894.
- Gietz, R.D. et al., 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast (Chichester, England)*, 11(4), pp.355–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7785336> [Accessed January 6, 2017].
- Giordani, F. et al., 2014. Characterization of a melamino nitroheterocycle as a potential lead for the treatment of human african trypanosomiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(10), pp.5747–5757.
- Goad, L.J. et al., 1989. The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action in vitro. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 32(2–3), pp.179–189.
- Goes, G.R. et al., 2016. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(4), pp.1–25.
- Gonzalez, N.S., Ceriani, C. & Algranati, I.D., 1992. Differential regulation of putrescine uptake in *trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 188(1), pp.120–128.

- Gourbal, B. et al., 2004. Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by an aquaglyceroporin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), pp.31010–31017.
- Grothe, S. et al., 1986. Proline transport and osmotic stress response in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*, 166(1), pp.253–259. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3514577](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3514577).
- Guhl, F., 2009. Enfermedad de Chagas : Realidad y perspectivas. , 20(18), pp.228–234.
- Guhl F & Lazdins-Helds, J., 2007. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. *World Health Organization*.
- Gull, K., 2003. Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: A flagellar pocketful of goodies. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), pp.365–370.
- Gull, K., 1999. The Cytoeskeleton of Trypanosomatid Parasites. *Annual Review of Microbiology*.
- Hall, B.S., Bot, C. & Wilkinson, S.R., 2011. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), pp.13088–13095.
- Hall, B.S. & Wilkinson, S.R., 2012. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), pp.115–123.
- Harington, J.S., 1961. Studies of the amino acids of Rhodnius prolixus. I. Analysis of the haemolymph. *Parasitology*, 51(3–4), pp.309–318. Available at: <https://www.cambridge.org/core/article/div-class-title-studies-of-the-amino-acids-of-span-class-italic-rhodnius-prolixus-span-i-analysis-of-the-haemolymph-div/CFF25EB525C16AF437439DFC6031927E>.
- Hasne, M. & Barrett, M.P., 2000. Drug uptake via nutrient transporters in Trypanosoma brucei. *Journal of applied microbiology*, 89(4), pp.697–701. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054175>.
- Hasne, M.P. et al., 2010. A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from Trypanosoma cruzi. *Molecular Microbiology*, 76(1), pp.78–91.
- Hasne, M.P. & Ullman, B., 2005. Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite Leishmania major. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), pp.15188–15194.
- Hediger, M. a, 1994. Structure, function and evolution of solute transporters in prokaryotes and eukaryotes. *The Journal of experimental biology*, 196, pp.15–49.
- van Hellemond, J.J. & Tielens, A.G.M., 2006. Adaptations in the lipid metabolism of the protozoan parasite Trypanosoma brucei. *FEBS Letters*, 580(23), pp.5552–5558.
- Hill, K.L., 2003. Biology and mechanism of trypanosome cell motility. *Eukaryotic Cell*, 2(2), pp.200–208.

- Homsy, J., Granger, B. & Krassner, S., 1989. Some Factors Inducing Formation of Metacyclic Stages of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of protozoology*, 36(2), pp.150–153.
- Inbar, E. et al., 2013. A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses. *The Biochemical journal*, 449(2), pp.555–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22994895>.
- Inbar, E. et al., 2012. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. *Amino Acids*, 42(1), pp.347–360.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), pp.23–28.
- Ivens, A.C. et al., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), pp.436–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1470643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jagu, E. et al., 2016. Synthesis and in vitro antikinoplastid activity of polyamine – hydroxybenzotriazole conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, pp.4–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.10.013>.
- Janeway, C.A. & Humphrey, J.H., 1968. Synthetic antigens composed exclusively of L- or D-amino acids: II. Effect of optical configuration on the metabolism and fate of synthetic polypeptide antigens in mice. *Immunology*, 14(2), pp.225–234.
- Janeway, C.A. & Sela, M., 1967. Synthetic antigens composed exclusively of L- or D-amino acids: I. Effect of optical configuration on the immunogenicity of synthetic polypeptides in mice. *Immunology*, 13(1), pp.29–38.
- Jannin, J. & Villa, L., 2007. An overview of Chagas disease treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(Suppl. I), pp.95–7.
- Kaino, T. & Takagi, H., 2008. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), pp.273–283.
- Kaul, S., Sharma, S.S. & Mehta, I.K., 2008. Free radical scavenging potential of L-proline: Evidence from in vitro assays. *Amino Acids*, 34(2), pp.315–320.
- Kelly, J.M. et al., 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Research*, 20(15), pp.3963–3969.
- Klenke, B. et al., 2001. Synthesis and biological evaluation of s-triazine substituted polyamines as potential new anti-*Trypanosomal* drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(21), pp.3440–3452.
- De Koning, H.P., Bridges, D.J. & Burchmore, R.J.S., 2005. Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: From biology to therapy. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), pp.987–1020.

- Krauth-Siegel, R.L., Bauer, H. & Schirmer, R.H., 2005. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(5), pp.690–715.
- Krauth-Siegel, R.L., Meiering, S.K. & Schmidt, H., 2003. The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. *Biological Chemistry*, 384(4), pp.539–549.
- Krishnan, N. & Becker, D.F., 2006. Oxygen reactivity of PutA from Helicobacter species and proline-linked oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 188(4), pp.1227–1235.
- Krishnan, N., Dickman, M.B. & Becker, D.F., 2008. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(4), pp.671–681.
- Kwok, L.Y. et al., 2003. The antioxidant systems in Toxoplasma gondii and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Molecular Microbiology*, 51(1), pp.47–61. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.2003.03823.x> [Accessed November 8, 2016].
- Lander, N. et al., 2015. CRISPR / Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in Trypanosoma cruzi Reveals Their Role in Flagellar. *mBio*, 6(4), pp.1–12.
- Landfear, S.M., 2011. Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa. *Eukaryotic Cell*, 10(4), pp.483–493.
- Landfear, S.M., 2003. Trypanosomatid transcription factors: waiting for Godot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), pp.7–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=140865&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Landfear, S.M. & Ignatushchenko, M., 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(1), pp.1–17.
- Langousis, G. & Hill, K.L., 2014. Motility and more: the flagellum of Trypanosoma brucei. *Nature reviews. Microbiology*, 12(7), pp.505–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931043>.
- Lee, S.H., Stephens, J.L. & Englund, P.T., 2007. A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nature reviews. Microbiology*, 5(4), pp.287–297.
- Liang, X., Haritan, A. & Uliel, S., 2003. trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors, and Regulation. *Eukaryotic cell*, 2(5), pp.830–840.
- Livore, V.I., Tripodi, K.E.J. & Uttaro, A.D., 2007. Elongation of polyunsaturated fatty acids in trypanosomatids. *FEBS Journal*, 274(1), pp.264–274.
- Lizzi, F. et al., 2012. Conjugation of quinones with natural polyamines: Toward an expanded antitrypanosomatid profile. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(23), pp.10490–10500.



- López-Burillo, S., García-Sancho, J. & Herreros, B., 1985. Tryptophan transport through transport system T in the human erythrocyte, the Ehrlich cell and the rat intestine. *BBA - Biomembranes*, 820(1), pp.85–94.
- Magdaleno, A. et al., 2009. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 4(2).
- Mair, G. et al., 2000. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 6(2), pp.163–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1369902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mantilla, B.S. et al., 2015. Role of  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), pp.7767–7790.
- Marchini, F.K. et al., 2011. Profiling the *Trypanosoma cruzi* Phosphoproteome. *PloS one*, 6(9), p.e25381. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3178638&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 15, 2011].
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-De-Rueda, J.C., et al., 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., et al., 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, p.525241. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2821653&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 19, 2011].
- Martínez-Calvillo, S., López, I. & Hernández, R., 1997. pRIBOTEX expression vector: A pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene*, 199(1–2), pp.71–76.
- Martins, R.M. et al., 2009. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infection and Immunity*, 77(7), pp.3023–3032.
- Mathieu, C. et al., 2017. Arginine and lysine transporters are essential for *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*, pp.1–23.
- Mathieu, C. et al., 2014. *Trypanosoma brucei* eflornithine transporter AAT6 is a low affinity, low selective transporter for neutral amino acids. *Biochem J*, 18, pp.9–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24988048>.
- Matthews, K.R., Tschadi, C. & Ullu, E., 1994. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes and Development*, 8(4), pp.491–501.
- Maugeri, D.A. & Cazzulo, J.J., 2004. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), pp.117–123.
- Mc Carthy, O.K. et al., 2006. Design, synthesis and evaluation of novel uracil amino acid

- conjugates for the inhibition of *Trypanosoma cruzi* dUTPase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(14), pp.3809–3812.
- McCabe, R.E., Remington, J.S. & Araujo, F.G., 1986. In vitro and in vivo effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*, 35(2), pp.280–284. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3006529>.
- Meyer, A. et al., 2006. AtGAT1, a high affinity transporter for g-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 281(11), pp.7197–7204. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/281/11/7197>.
- Meyer, H. & Oliveira, M.X. De, 1948. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: a four-year study\*. *Parasitology*, 39(1–2), pp.91–94. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0008916643&partnerID=tZ0tx3y1>.
- Miranda, M.R. et al., 2012. Cationic amino acid uptake constitutes a metabolic regulation mechanism and occurs in the flagellar pocket of *trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 7(2), pp.3–9.
- Miranda, M.R. et al., 2006. *Trypanosoma cruzi*: Oxidative stress induces arginine kinase expression. *Experimental Parasitology*, 114(4), pp.341–344.
- Molina, I. et al., 2014. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *The New England journal of medicine*, 370, pp.1899–908. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24827034>.
- Molina, J. et al., 2000. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(1), pp.150–155.
- Montemartini, M. et al., 1995. A recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi* has both tyrosine aminotransferase and alanine aminotransferase activities. *FEMS Microbiology Letters*, 133(1–2), pp.17–20.
- Montemartini, M. et al., 1993. Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical journal*, 292 ( Pt 3, pp.901–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1134199&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mony, B.M. et al., 2014. Genome wide dissection of the quorum sensing signaling pathway in *Trypanosoma brucei*. , 505(7485), pp.681–685.
- Moreno, M. et al., 2010. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(7), pp.918–924.
- Morillo, C.A. et al., 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 373(14), pp.1295–1306. Available at:

<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1507574>.

- Mumberg, D., Müller, R. & Funk, M., 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156(1), pp.119–122.
- Natarajan, S.K. et al., 2012. Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(5), pp.1181–1191.
- Nowicki, C. & Cazzulo, J.J., 2008. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 151(3), pp.381–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433885>.
- Paes, L.S. et al., 2013. Proline Dehydrogenase Regulates Redox State and Respiratory Metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 8(7).
- Peng, D. et al., 2015. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *mBio*, 6(1), pp.1–11.
- Pereira, C.A. et al., 1999. L-Arginine Uptake and L-Phosphoarginine Synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(6), pp.566–570.
- Pereira, C.A. et al., 2000. *Trypanosoma cruzi* Arginine Kinase Characterization and Cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. *Biochemistry*, 275(2), pp.1495–1501.
- Pereira, C.A. & Silber, A.M., 2012. On the evolution of hexose transporters in Kinetoplastid potozoans. *PLoS ONE*, 7(5), pp.1–10.
- Pereira, C. a et al., 2003. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. *FEBS Letters*, 554(1–2), pp.201–205. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579303011712> [Accessed August 25, 2011].
- Pereira, C. a et al., 2002. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. *FEBS letters*, 526(1–3), pp.111–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208515>.
- Pereira, C. a et al., 2011. Singular features of trypanosomatids' phosphotransferases involved in cell energy management. *Enzyme research*, 2011, p.576483. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3092577&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 22, 2011].
- Perez, C.J., Lymbery, A.J. & Thompson, R.C.A., 2015. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. *Trends in Parasitology*, 31(11), pp.595–603. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.006>.
- Piacenza, L. et al., 2008. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *The Biochemical journal*, 410(2), pp.359–68. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2441817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Prati, F. et al., 2014. Quinone-amino acid conjugates targeting leishmania amino acid transporters. *PLoS ONE*, 9(9), pp.1–11.
- Le Quesne, S. & Fairlamb, A.H., 1996. Regulation of a high-affinity diamine transport system in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. , pp.481–486.
- Rajão, M.A. et al., 2014. Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(4), pp.309–321.
- Reigada, C. et al., 2016. *Trypanosoma cruzi* Polyamine Transporter: Its Role on Parasite Growth and Survival Under Stress Conditions. *Journal of Membrane Biology*, 249(4), pp.475–481.
- Reina-San-Martín, B. et al., 2000. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nature medicine*, 6(8), pp.890–897.
- Robinson, K.A. & Beverley, S.M., 2003. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 128(2), pp.217–228.
- Rohloff, P. & Docampo, R., 2009. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. , 118(1), pp.17–24.
- Rohloff, P., Rodrigues, C.O. & Docampo, R., 2003. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid flux and changes in intracellular calcium. *Science*, d, pp.219–230.
- Schlisselberg, D. et al., 2015. Size does matter: 18 amino acids at the N-terminal tip of an amino acid transporter in *Leishmania* determine substrate specificity. *Scientific Reports*, 5(November), p.16289. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep16289>.
- Seiler, N., Delcros, J.G. & Moulinoux, J.P., 1996. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28(8), pp.843–861.
- Siegel, T.N. et al., 2009. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes and Development*, 23(9), pp.1063–1076.
- Silber, A.M. et al., 2002. Active Transport of L-Proline in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(6), pp.441–446.
- Silber, A.M. et al., 2005. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Current drug targets. Infectious disorders*, 5(1), pp.53–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777198>.
- Silber, A.M. et al., 2009. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 168(1), pp.102–108.
- Sosa-Estani, S., Viotti, R. & Segura, E.L., 2009. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl(June), pp.167–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753472>.

- De Souza, W., 1999. A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi* : from 1909 to 1999. *Most*, 94, pp.17–36.
- De Souza, W., 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*, 8(4), pp.269–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860366>.
- De Souza, W. et al., 2010. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. , 2010.
- De Souza, W., Carreiro, I.P. & Miranda, K., 2000. Two Special Organelles found in *Trypanosoma cruzi* \*. , 1958(Ormerod 1958).
- Steenkamp, D.J., 2002. Thiol metabolism of the trypanosomatids as potential drug targets. *IUBMB life*, 53(4–5), pp.243–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121003> [Accessed November 8, 2016].
- Tabor, C.W. & Tabor, H., 1984. Polyamines. *Annual Review of Biochemistry*, (53), pp.749–790.
- Taylor, M.C. & Kelly, J.M., 2006. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC biotechnology*, 6, p.32.
- Tetaud, E. et al., 2000. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. *Microbiology*, 91(August 1994), pp.8278–8282.
- Tetaud, E. et al., 1997. Kinetoplastid glucose transporters. *The Biochemical journal*, 325 ( Pt 3, pp.569–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1218597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Thomas, E.L. & Christensen, H.N., 1970. Indications of Spatial Relations among Structures Recognizing Amino Acids and Na<sup>+</sup> at a Transport Receptor Site. *Biochemical and biophysical research communications*, 40(2).
- Tibayrenc, M. & Tellería, J., 2010. *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*, Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.X0001-9>.
- Tonelli, R.R. et al., 2004. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cellular microbiology*, 6(8), pp.733–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15236640> [Accessed September 26, 2011].
- Tripodi, K.E.J. et al., 2006. Functional characterization of front-end desaturases from trypanosomatids depicts the first polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway from a parasitic protozoan. *FEBS Journal*, 273(2), pp.271–280.
- Tsirigos, K.D. et al., 2015. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), pp.W401–W407.
- Turrens, J.F., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: A target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1–2), pp.211–220.
- Turrens, J.F. & McCord, J.M., 2006. The iron-containing superoxide dismutases of

- Trypanosomatidae. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(2), pp.193–195.
- Tye, C. et al., 1998. An approach to use an unusual adenosine transporter to selectively deliver polyamine analogues to trypanosomes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8(98), pp.811–816.
- Tyler, K.M. & Engman, D.M., 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5–6), pp.472–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11334932>.
- Urbina, J.A., 1994. Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today*, 1(3), pp.107–110.
- Vazquez, M.P., 2007. The Genetics and Genomics of *Trypanosoma cruzi*. *Pharmaceutical Sciences*.
- Vazquez, M.P. & Levin, M.J., 1999. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2B gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene*, 239(2), pp.217–225.
- Verbruggen, N. & Hermans, C., 2008. Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*, 35(4), pp.753–759.
- Verslues, P.E. & Sharma, S., 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, 8, p.e0140. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3244962&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vincent, I.M. et al., 2010. A molecular mechanism for eflornithine resistance in African trypanosomes. *PLoS Pathogens*, 6(11), pp.1–9.
- Van Winkle, L.J. et al., 1990. Transport of benzenoid amino acids by system T and four broad scope systems in preimplantation mouse conceptuses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1027(3), pp.268–277.
- World Health Organization, 2015. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*, (6), pp.33–44.
- World Health Organization & Mundo Sano, 2007. La Enfermedad de Chagas. A la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral.
- Xu, D. et al., 2009. Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. *BMC microbiology*, 9, p.90.
- Zhang, L., Alfano, J.R. & Becker, D.F., 2015. Proline metabolism increases katG expression and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 197(3), pp.431–440.
- Zingales, B. et al., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), pp.240–253.

# **Difusión de Resultados**

---

Se enumeran a continuación las publicaciones y presentaciones a congresos donde fueron difundidos los resultados de esta tesis.

### Publicaciones

- **SAYE M**; MIRANDA MR; DI GIROLAMO F; CAMARA MM; PEREIRA CA. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. PLoS One. Marzo **2014** 17;9(3):e92028. doi: 10.1371/journal.pone.0092028. eCollection 2014.
- **SAYE M**; MIRANDA MR; REIGADA C; PEREIRA CA. *Trypanosoma cruzi* Proline Transport Presents a Cell Density-dependent Regulation. The Journal of Eukaryotic Microbiology. **2016** Jan 10. doi: 10.1111/jeu.12295.
- **SAYE M**; FARGNOLI L; LABADIE G; PEREIRA CA. Evaluation of proline analogs as trypanocidal agents through the inhibition of a *Trypanosoma cruzi* proline transporter. **2017**. Manuscrito en revision.

### Presentaciones a congresos

#### **-AÑO 2012**

- XXV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. Congreso. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. "Estudio de la permeasa de prolina de *Trypanosoma cruzi*". Autores: **SAYE M**; CAMARA MM; DI GIROLAMO F; PEREIRA CA; SILBER AM; MIRANDA MR.
- XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia. Congreso. Brasil. "Molecular characterization of a specific L-proline permease from *Trypanosoma cruzi*". Autores: SILBER AM; **SAYE M**; MIRANDA MR; CAMARA MM; PEREIRA CA.
- XI Jornadas Científicas del Instituto Lanari. Jornadas. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. "Transporte de prolina en *Trypanosoma cruzi*". Autores: **SAYE M**; CAMARA MM; DI GIROLAMO F; PEREIRA CA; MIRANDA MR.

#### **-AÑO 2013**

- XV Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología. Congreso. Buenos Aires, Argentina. "Transporte de prolina en *Trypanosoma cruzi*: su importancia en la resistencia a estrés oxidativo y a drogas tripanocidas". **Presentación premiada**. Autores: **SAYE M**; MIRANDA MR; DI GIROLAMO F; CAMARA MM; PEREIRA CA.
- 1º Jornadas de Doctorandos y Estudiantes Avanzados de CyT. Jornadas. Buenos Aires, Argentina. "Estudio del transportador de prolina de *Trypanosoma cruzi*". Autores: **SAYE M**; CAMARA MM; MIRANDA MR; PEREIRA CA.
- XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. Congreso. Santa Fe, Argentina. "El transporte de prolina en *Trypanosoma cruzi* y su rol en la resistencia a drogas y estrés oxidativo". Autores: **SAYE M**; CAMARA MM; DI GIROLAMO F; MIRANDA MR; PEREIRA CA.
- XII Jornadas Científicas del Instituto Lanari. Jornadas. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. "La prolina confiere resistencia a estrés oxidativo y drogas en el parásito *Trypanosoma cruzi*". Autores: **SAYE M**; CAMARA MM; DI GIROLAMO F; MIRANDA MR; PEREIRA CA.



#### **-AÑO 2014**

- XIII Jornadas Científicas del Instituto Lanari. Jornadas. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. "Estudio funcional y de la regulación del transportador de prolina de *Trypanosoma cruzi*". Autores: **SAYE M**; REIGADA C; DI GIROLAMO F; MIRANDA MR; PEREIRA CA.
- X Congreso de Protozoología y enfermedades parasitarias. Congreso. Buenos Aires, Argentina. "Estudio funcional y de la regulación del transportador de prolina de *Trypanosoma cruzi*". Autores: **SAYE M**; REIGADA C; DI GIROLAMO F; MIRANDA MR; PEREIRA CA.
- XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia. Congreso. Brasil. "*Trypanosoma cruzi*: increased proline uptake and oxidative stress". Autores: ROCHA SC; **SAYE M**; SILBER AM; PEREIRA CA.

#### **-AÑO 2015**

- XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. Congreso. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. "Estudio de la regulación del transporte de prolina en *Trypanosoma cruzi*". Autores: **SAYE M**; REIGADA C; MIRANDA MR; VALERA VERA E; DI GIROLAMO F; PEREIRA CA.
- XVII Simposio sobre Enfermedades Desatendidas. Simposio. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. "Transporte de prolina en *Trypanosoma cruzi* Como vía de entrada de drogas tripanocidas". Autores: **SAYE M**; FARGNOLI L; LABADIÉ G; PEREIRA CA.

#### **-AÑO 2016**

- XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. Congreso. Santa Fe, Argentina. "Análogos sintéticos de prolina: Efecto tripanocida y acción sobre el transportador TcAAAP069 de *Trypanosoma cruzi*". Autores: **SAYE M**; FARGNOLI L; LABADIE G; PEREIRA CA.

# Proline Modulates the *Trypanosoma cruzi* Resistance to Reactive Oxygen Species and Drugs through a Novel D, L-Proline Transporter

Melisa Sayé, Mariana R. Miranda, Fabio di Girolamo, María de los Milagros Cámara, Claudio A. Pereira\*

Laboratorio de Biología Molecular de *Trypanosoma cruzi* (LBMTC), Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari", Universidad de Buenos Aires and CONICET, Buenos Aires, Argentina

## Abstract

*Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, has a metabolism largely based on the consumption of glucose and proline. This amino acid is essential for host cells infection and intracellular differentiation. In this work we identified a proline transporter (TcAAAP069) by yeasts complementation assays and overexpression in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. TcAAAP069 is mono-specific for proline but presents an unusual feature; the lack of stereospecificity, because it is competitively inhibited by the D- enantiomer. Parasites overexpressing TcAAAP069 have an increased intracellular proline concentration, 2.6-fold higher than controls, as a consequence of a higher proline transport rate. Furthermore, augmented proline concentration correlates with an improved resistance to trypanocidal drugs and also to reactive oxygen species including hydrogen peroxide and nitric oxide, emulating natural physiological situations. The IC<sub>50</sub>s for nifurtimox, benznidazole, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO<sup>-</sup> were 125%, 68%, 44% and 112% higher than controls, respectively. Finally, proline metabolism generates a higher concentration (48%) of ATP in TcAAAP069 parasites. Since proline participates on essential energy pathways, stress and drug resistance responses, these results provide a novel target for the development of new drugs for the treatments for Chagas' disease.

**Citation:** Sayé M, Miranda MR, di Girolamo F, de los Milagros Cámara M, Pereira CA (2014) Proline Modulates the *Trypanosoma cruzi* Resistance to Reactive Oxygen Species and Drugs through a Novel D, L-Proline Transporter. PLoS ONE 9(3): e92028. doi:10.1371/journal.pone.0092028

**Editor:** M Carolina Elias, Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Brazil

**Received:** October 28, 2013; **Accepted:** February 19, 2014; **Published:** March 17, 2014

**Copyright:** © 2014 Sayé et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 2010-0685 and 2011-0263), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT PICT 2008-1209, 2010-0289 and 2012-0559), and Fundación Bunge y Born (grant 2012). CAP and MRM are members of the career of scientific investigator and MdMC and MS are research fellows from CONICET. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: cpereira@retina.ar

## Introduction

*Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, has a metabolism largely based on the consumption of amino acids, mainly proline, which constitutes the main carbon and energy source in the insect stage of the parasite life cycle. L-proline is an important metabolite since it is involved in the differentiation of intracellular epimastigote to trypomastigote forms, which is required for the establishment of infection in the mammalian host [1]. Previous works showed that L-proline is taken up from the extracellular media through two active transport systems [2] and then converted into intermediates of the Krebs cycle, pyruvate, glutamate and aspartate, which are rapidly metabolized [3,4]. Recently, the proline oxidation pathway was described in *T. cruzi*. L-proline is oxidized to pyrroline-5-carboxylate by a mitochondrial proline dehydrogenase regulating the redox state of the cell and the respiratory metabolism [5]. Proline also participates in different mechanisms of stress resistance. The ability of proline to suppress reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in mammalian cells involves the secondary amine of its pyrrolidine ring, and it was demonstrated manipulating intracellular proline concentration by adding the amino acid to the medium or endogenously by altering proline dehydrogenase levels [6,7]. In addition, osmotic stress that occurs within the gut of the

triatomine vector and also in the vertebrate host, initially causes swelling, but this is rapidly adjusted by a compensatory volume reversal associated with a selective amino acid efflux, mainly alanine and proline [8].

Not only L-proline is present in *T. cruzi*, the D-enantiomer was also found in these parasites, even though its roles were only partially elucidated. Proline racemases interconvert the L and D-enantiomers of proline. The description of a mitogen with proline racemase activity raised the possibility for the existence of a D-amino acid metabolism in *T. cruzi* [9]. It was proposed that this enzyme might take part in a chemical compartmentalization of the intracellular pool of proline, which is a major energy reservoir for the intracellular stages differentiation. Two proline racemase isoforms are present in *T. cruzi*; they are differentially expressed during parasite development and participate in mechanisms of virulence acquisition [10]. In addition to free D-amino acids, non-infective epimastigote and infective metacyclic parasite samples possess peptides composed of D-proline probably providing resistance against host proteolytic mechanisms [11].

In *T. cruzi*, proline uptake is mediated by two different transport systems. A low affinity, high specificity, system B; and a high affinity, low specificity, system A [2]. Recently, a new neutral amino acid transporter that translocates proline and alanine was described in *Leishmania donovani*. This transporter is the unique

supplier for the intracellular pool of proline and contributes to the alanine pool; it is essential for cell volume regulation after osmotic stress; and it regulates transport and homeostasis of other unrelated amino acids [12].

The effects of interfering L-proline transport and metabolism was recently studied using the proline analogue L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C). Evidences suggest that T4C affects the parasites viability and also other aspects of the *T. cruzi* life cycle especially under nutrient starvation and oxidative stress conditions [13].

The first multigenic family of amino acid transporters from *T. cruzi* (TcAAAP; Amino Acid/Auxin Permeases; TC 2.A.18) was identified by our group [14]. One interesting feature of these permeases is the absence of orthologs in mammalian genomes [15]. Few members of this family have been characterized in trypanosomatids, including an arginine and lysine permeases [16,17,18,19].

In this work we have identified and functionally characterized a novel proline permease from the TcAAAP family. Since this transporter has many differential features compared to those present in mammalian host cells and proline is essential for parasite survival, we hypothesize that it is possible to develop a specific inhibitor of this *T. cruzi* permease with a minimal effect on the host cells.

## Materials and Methods

### Cell cultures

Epimastigotes of Y (DTU *T. cruzi* II) and MJ Levin (DTU *T. cruzi* I) strains [16] were cultured at 28 °C in plastic flasks (25 cm<sup>2</sup>), containing 5 mL of LIT medium (started with 10<sup>6</sup> cells per milliliter) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin [20]. The parasites were subcultured with passages each 7 days. Cells were counted using a hemocytometer.

Stress assays were performed by adding the indicated concentrations of the drugs to 1.5 mL aliquots containing 5 × 10<sup>6</sup> parasites in LIT medium and then were cultivated during 48–96 h in 24-wells plates. After this period cells were counted using a hemocytometer.

The *S. cerevisiae* strain MG266 (gap1, put4) [21] was kindly provided by Dr. Susana Correa, FCEN-UBA, Argentina. MG266 strain was maintained on complete yeast extract/peptone/dextrose medium. Ura<sup>+</sup> transformants were selected on SC medium, which is composed by 2% glucose, 0.17% yeast nitrogen base (without amino acids), 0.5% ammonium sulfate and 2% agar. Yeasts were transformed with the pDR196 or p416 vectors containing ten different TcAAAP genes and empty vectors were used as controls, according to Gietz and Woods [22].

### Proline transport assays

Aliquots of epimastigote cultures (10<sup>7</sup> parasites) or yeast cultures (1 OD) were centrifuged at 8,000 × g for 30 s, and washed once with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were resuspended in 0.1 mL PBS and then added 0.1 mL of the transport mixture containing 1 mM L-(<sup>3</sup>H) proline (PerkinElmer's NEN® Radiochemicals; 0.4 µCi). Following incubation at 28 °C, reaction was stopped by adding 1 mL of ice-cold PBS. Cells were centrifuged as indicated above, and washed twice with ice-cold PBS. Cell pellets were resuspended in 0.2 mL of water and counted for radioactivity in UltimaGold XR liquid scintillation cocktail (Packard Instrument Co., Meriden CT, USA) [23]. Assays were run at least by triplicate. Cell viability was assessed by direct microscopic examination. Non-specific uptake and carry over were measured

in transport mixture at without incubation (T<sub>0</sub>), or incubated at 4 °C.

### Plasmid construction and parasite transfection

TcAAAP069, TcBilbo1 and TcAQP genes (GeneDB IDs: Tc00.1047053504069.120, Tc00.1047053511127.20, and Tc00.1047053508257.140, respectively) were amplified using genomic *T. cruzi* DNA as template. Amplification products were subcloned into a modified pTREX expression plasmid called pTREXL [24] (TcAAAP069) and also fused to eGFP (TcAAAP069:eGFP and TcBilbo1:eGFP) or mCherry (TcAAAP069:mCherry and TcAQP:mCherry). Constructions were transfected into *T. cruzi* epimastigotes of Y and MJL strain as follows. 10<sup>8</sup> parasites grown at 28 °C in LIT medium were harvested by centrifugation, washed with PBS, and resuspended in 0.35 mL of electroporation buffer (PBS containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>). This cell suspension was mixed with 50 µg of plasmid DNA in 0.2 cm gap cuvettes (Bio-Rad Laboratories). The parasites were electroporated using a single pulse of (400 V, 500 µF) with a time constant of about 5 ms.

### Proline and ATP determinations

Proline determinations were performed using a ninhydrin colorimetric method as previously described [25]. ATP measurements were performed using the “ATP Bioluminescence Assay Kit HS II” (Roche) according to the manufacturer instructions.

### Fluorescence Microscopy

Epimastigote samples from the days 1–7 after transfection were washed twice with PBS. After letting the cells settle for 30 min at room temperature onto poly-L-lysine coated coverslips, parasites were fixed at room temperature for 20 min with 4% formaldehyde in PBS, followed by a cold methanol treatment for 5 min. Slides were mounted using Vectashield with DAPI (Vector Laboratories). Cells were observed in an Olympus BX60 fluorescence microscope. Images were recorded with an Olympus XM10 camera.

### Western Blot analysis

Western Blots were performed using total *T. cruzi* extracts fractionated by electrophoresis in polyacrylamide denaturing gels and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. The PVDF membranes were treated for 1 h with 5% non-fat dry milk in PBS and then incubated with the corresponding primary antibody overnight, (anti-triFlag diluted 1:2500 –Abcam–; anti-arginine kinase diluted 1:4000). Membranes were washed and incubated with the secondary antibody for two hours (anti-mouse HRP 1:2500, Vector Labs). Detection was done by chemiluminescence (Pierce).

### Bioinformatics

Sequences from the Trityps genome projects were obtained at TcruziDB (<http://tcruzidb.org/>) and GeneDB (<http://www.genedb.org/>). Analysis of the DNA sequence data were carried out using the software package Vector NTI v. 10.3.0 (Invitrogen) and the online version of BLAST at the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Local or online software were used under default parameters. The sequences were analyzed for the presence of transmembrane spans by using SOSUI v. 1.11 [26], TMHMM v. 2.0 [27], TMPRED v. 1.0 (<http://www.ch.embnet.org/>) and HMMTOP v. 2.0 (<http://www.enzim.hu/>). Topology was schematized using the TMRPres2D software (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/>). Phenogram representation of amino acid sequences

was constructed using TreeView 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/>).

### Statistics and kinetic parameters calculation

Each experiment was carried out at least three times (replicates). Data were analyzed as follows: first normal distribution was tested using a Kolmogorov-Smirnov test and all groups presented a normal distribution. Afterwards, groups were analyzed using a one-way ANOVA followed by a post-hoc Dunnett's multiple comparison test using a significance cut-off value of  $P < 0.05$ . Standard procedures were used to determine kinetic parameters.  $K_m$  and  $V_{max}$  values were obtained by nonlinear regression fit of the data to the Michaelis-Menten equation. Statistics, curve fittings,  $V_{max}$  and  $K_m$  were calculated using the GraphPad Prism 6 software.

## Results

### Expression of the *T. cruzi* proline transporter in yeasts

With the aim of identifying a *T. cruzi* proline transporter, ten genes from the previously characterized TcAAP family have been subcloned in yeast expression vectors for complementation assays. After transformation of a yeast strain deficient in the proline permease (PUT4), cells were cultured in a medium containing proline as the sole nitrogen source. As figure 1A shows, only yeasts expressing the transporter TcAAP069 were able to grow under these conditions. The identity of this transporter is in accordance with the data published by Inbar et al. [12].

To confirm the function of TcAAP069, proline uptake assays were performed in the same yeast model (Figure 1B). The obtained transport rate was almost constant during 30 min. Calculated velocity for TcAAP069 transformed yeasts was  $85.9 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $\pm 4.7$ ) while control yeasts showed an inconsiderable activity ( $1.7 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $\pm 0.4$ ). In addition, the estimated Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for proline transport in yeasts transformed with TcAAP069 was  $11.64 \text{ mM}$  ( $\pm 4.08$ ).

In order to test the substrate specificity of TcAAP069, proline transport assays were accomplished in the presence of different amino acids with dissimilar structures, in a 10-fold molar excess respect to the proline concentration. Interestingly, none of the tested amino acids produce a significant inhibition of proline uptake demonstrating the high-specificity of TcAAP069. As a positive control an isotopic dilution using 10-fold higher proline concentration was included (Figure 1C).

### Functional and biochemical characterization of TcAAP069 in *T. cruzi*

To further study the functional properties of the transporter, we constructed a *T. cruzi* epimastigote model that overexpresses TcAAP069. These parasites provide a most appropriate physiological environment for additional experiments. Epimastigotes were transfected using the genes TcAAP069, and also GFP as control subcloned in the *T. cruzi* expression vector pTREXL (pTREX-069 and pTREX-GFP). After the selection period, a Western Blot analysis was performed to verify TcAAP069 expression, and a duplex band was observed (Supplementary Figure S1A, left panel); one corresponding to the permease and the other could be a fragment generated by a partial proteolysis or a post-translational modification.

Parasites transfected with TcAAP069 showed an average proline transport rate of  $417 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $\pm 22$ ) whereas in control parasites the transport rate was  $73 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $\pm 11$ ) (Figure 2A).

Related to the parasites' growth kinetics, it was observed that epimastigotes overexpressing TcAAP069 had a higher cell density than the GFP controls, about 30% between days 7 and 14 (Supplementary Figure S1A).

To confirm that TcAAP069 is functional in other strain of *T. cruzi* from a different discrete typing unit (DTU) it was also expressed in the Y strain [16]. Expression was verified by Western Blot analysis and the same band pattern was obtained in samples from both strains (Supplementary Figure S1A, left panel). Additionally, proline transport was measured in the Y strain obtaining an increase in the transport rate of 35% respect to controls, in parasites overexpressing TcAAP069 (Supplementary Figure S2A, right panel).

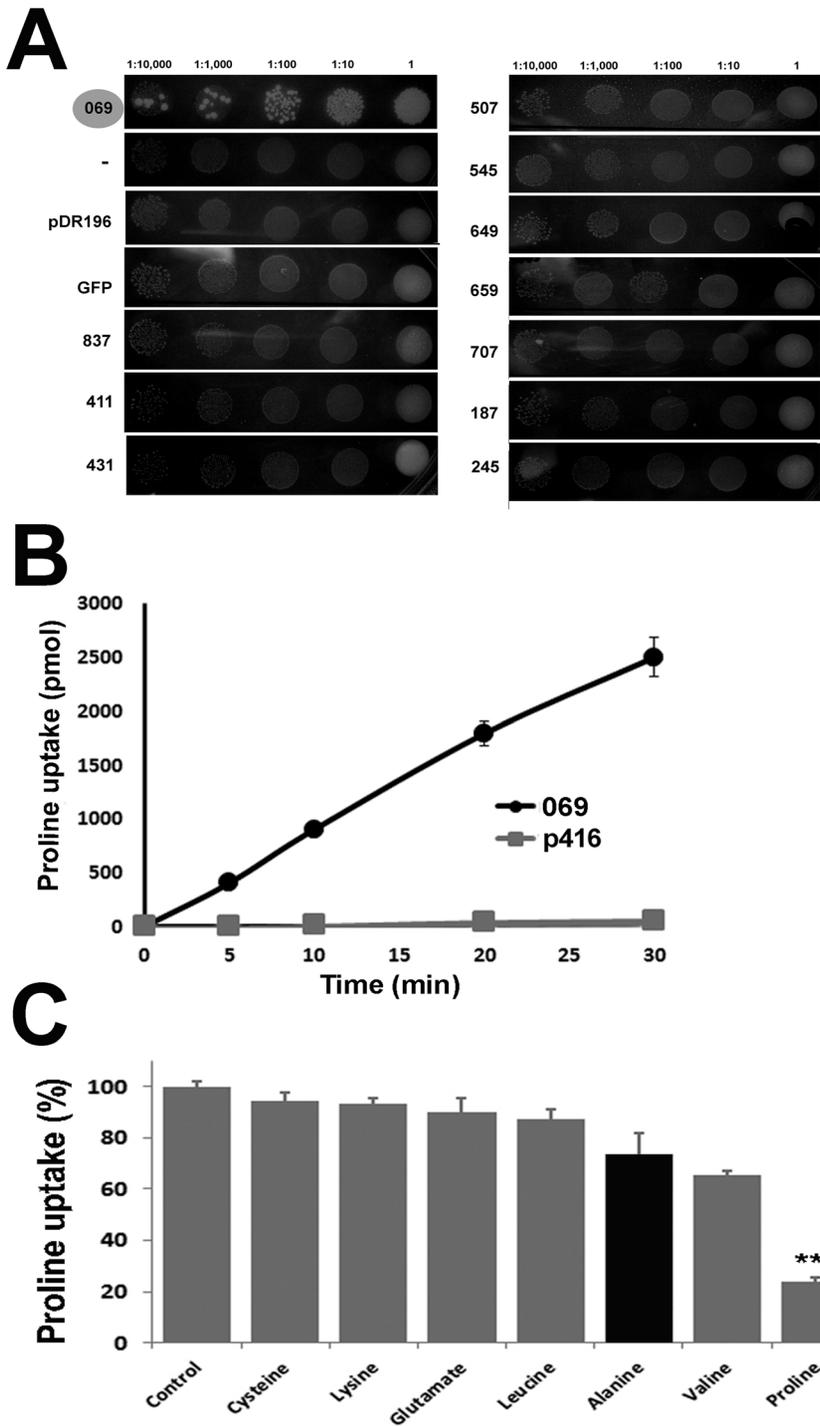
Given that one of the objectives of this work was to study the effects of the variation in the intracellular proline concentration, it was tested if an increase in the transport rate generates a higher proline concentration by accumulation of this amino acid. To address this point the total mass of intracellular proline was quantified in TcAAP069 and GFP parasites. Proline concentrations were  $6.4 \text{ mM}$  ( $\pm 0.2$ ) and  $2.5 \text{ mM}$  ( $\pm 0.1$ ) for TcAAP069 and GFP cells, respectively (Figure 2B, left panel). In accordance, parasites overexpressing TcAAP069 from Y strain also showed an augmented proline concentration, from  $1.9 \text{ mM}$  ( $\pm 0.3$ ) to  $3.2 \text{ mM}$  ( $\pm 0.7$ ) (65%) (Supplementary Figure 2A, right panel).

On the other hand, proline can produce reduced metabolic intermediates prior and during the TCA cycle, and also acts as a direct electron donor to the respiratory chain (Figure 2B, right panel). Therefore, it could be expected that an increase in proline concentration alters the cell energy balance. To test this hypothesis ATP levels were determined in TcAAP069 and GFP parasites showing an increase from  $1.30 \text{ mM}$  ( $\pm 0.1$ ) to  $1.92 \text{ mM}$  ( $\pm 0.3$ ) (48.3%) in epimastigotes overexpressing the proline permease (Figure 2B, left panel).

Previously reported inhibitors of proline transport and metabolism, such as L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C) [13] and also the proline analogue hydroxyproline (HYP), were tested as TcAAP069 inhibitors. Both compounds were assayed under the same conditions (10-fold molar excess). Although T4C produced a slight but significant inhibition of 44.21% ( $\pm 6.6$ ), HYP treatment almost abolished proline transport producing a 91.77% ( $\pm 1.9$ ) of inhibition (Figure 3A). These results are in accordance with the previously published by Magdaleno et al. [13].

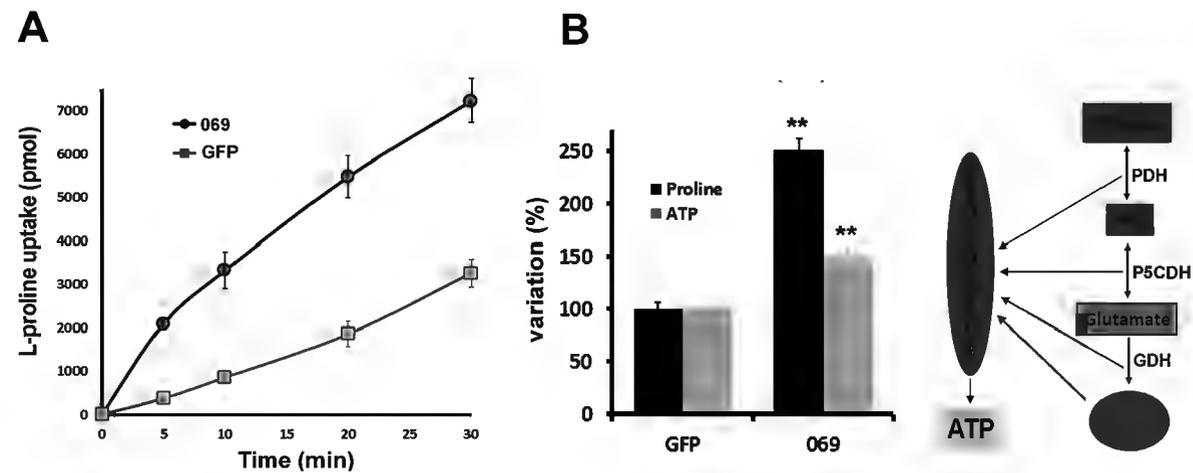
Considering that amino acids competition assays performed in yeasts complemented with TcAAP069 produced no significant inhibition on proline transport, an additional test was achieved using alanine, which was previously reported as a proline co-substrate in the *Leishmania* orthologue [12]. Unlike *Leishmania*, TcAAP069 parasites did not show a significant inhibition on proline transport in the presence of 10-fold molar excess of alanine (Figure 3A).

Finally, given that there are very few cases of non-stereospecific amino acid transporters and particularly in trypanosomatids there is no previous report on this type of permeases, L-proline transport was assayed in the presence of D-proline. Surprisingly, D-proline inhibited L-proline transport by a 76.3% ( $\pm 3.3$ ) (Figure 3A). Kinetics studies of L-proline transport in the presence of D-proline (10 mM) showed an increase in the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) from  $0.38 \text{ mM}$  ( $\pm 0.05$ ) to  $0.93 \text{ mM}$  ( $\pm 0.48$ ), whereas the maximum velocity ( $V_{max}$ ) remained constant (between  $416.0$  and  $303.0 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $P$  value = 0.1745) adjusting to a competitive inhibition model (Figure 3B). The physiological role of D-proline transport could be associated to the presence of proline racemases in trypanosomatids, as discussed below.



**Figure 1. Expression and biochemical characterization of TcAAAP069 in yeasts.** A) *S. cerevisiae* strain MG266 (gap1, put4) was transformed with the pDR196 plasmid harboring the genes: GFP, TcAAAP187, TcAAAP245, TcAAAP411, TcAAAP431, TcAAAP545, TcAAAP507, TcAAAP649, TcAAAP659, TcAAAP707, TcAAAP837 and TcAAAP069 or an empty pDR196 plasmid, and tested for growth in standard minimal medium (SD). Transformed strains were placed in drops containing approximately 10,000, 1,000 and 100 cells. Plates were photographed after 3 days of growth. B) L-(<sup>3</sup>H) proline uptake in yeasts transformed with the construct p416-TcAAAP069 (069, black line ●) or an empty p416 control (p416, gray line ■). Transport experiments with 1 mM L-proline were performed using transformed yeasts grown up to exponential phase in SD medium and assayed for L-proline uptake in the interval 0–30 minutes. C) L-Proline transport inhibition assays were achieved using 1 mM L-proline and 10 mM of the different amino acid tested.

doi:10.1371/journal.pone.0092028.g001



**Figure 2. Functional studies of TcAAAP069 by overexpression in *T. cruzi* epimastigotes.** A) Radiolabeled L-proline (1 mM) transport was measured in TcAAAP069 overexpressing parasites (069; black line ●) and GFP controls (GFP; gray line ■) in the range 0–30 minutes (left panel) using  $10^7$  parasites per assay. B) Intracellular proline (black bars) and ATP (gray bars) concentrations were measured in epimastigotes transfected with pTREC-TcAAAP069 (069) or the control pTREC-GFP (GFP). Intracellular proline and ATP concentrations were measured using the ninhydrin colorimetric technique and a bioluminescence method, respectively (left panel). Schematic representation of the different ATP-producing steps of the *T. cruzi* proline catabolism pathway (right panel). doi:10.1371/journal.pone.0092028.g002

### Bioinformatic analysis of TcAAAP069

All thirty-six members of the TcAAAP family, which were previously identified in the *T. cruzi* genome [14], have been schematized in a tree-type phenogram constructed according their amino acid identity (Supplementary Figure S3A). In the same branch of TcAAAP069 two additional genes were found. The first one (TcAAAP229) probably corresponds to an allele of TcAAAP069, which has a putative N-terminal extension of 62 amino acids length. Excluding this region, both alleles have 99% of amino acids consensus (Supplementary Figure S3B). The second protein of this branch, called TcAAAP733, has 42% of amino acid consensus with TcAAAP069. Both proteins have a very similar structure with 10 transmembrane spans and a very similar length of the intracellular N-termini, intra and extracellular loops (Supplementary Figure S3C). Considering that TcAAAP229 is probably an allele, TcAAAP733 could be a second proline transporter in accordance with the biochemical evidences that proposed the presence of two proline transport systems with different substrate affinities [2]. Nevertheless, yeasts complemented with TcAAAP733 showed no significant increase in L-proline transport but presented an active transport of an amino acid mix. However, TcAAAP733 substrates remain to be identified in a *T. cruzi* model thus its role as a proline transporter could be not ruled out.

### TcAAAP069 and resistance to ROS and trypanocidal drugs

In plants, it was proposed that proline itself could act as an intracellular ROS scavenger and also as a protection against different stresses by regulating enzymes of its own metabolism [28,29]. However, the participation of proline transport systems in such processes has never been demonstrated. To test if an increased proline transport and intracellular concentration affect the cellular resistance to stress, treatments using different hydrogen peroxide concentrations were performed in yeasts expressing TcAAAP069. Results showed that TcAAAP069 significantly increases the yeasts resistance to hydrogen peroxide ( $IC_{50}$ s 122.4 mM and 55.91 mM for TcAAAP069 and control, respec-

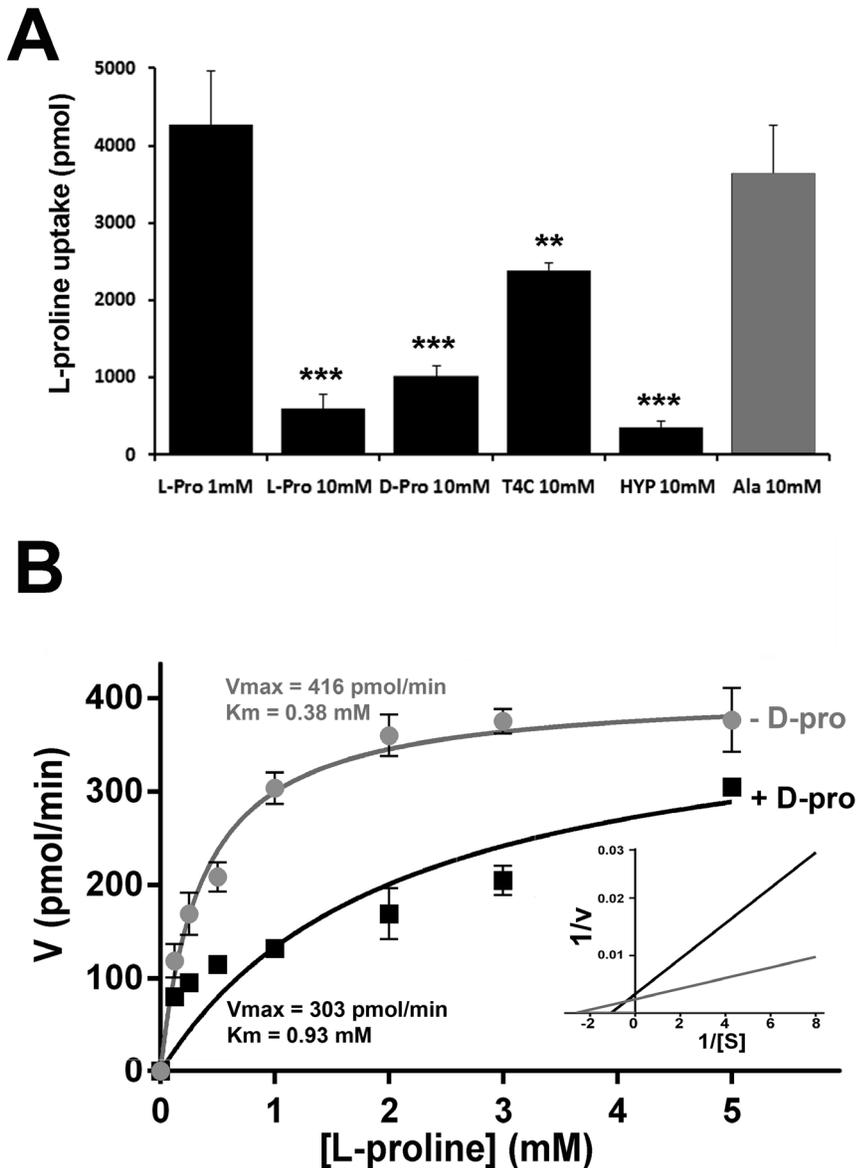
tively. P value = 0.001) (Figure 4A, inset). Macrophages kill the trypomastigotes producing nitric oxide which is catalyzed by the inducible NO synthase [30]. Given these data, different stress conditions including hydrogen peroxide and diethylamine NON-Oate, a nitric oxide donor, were tested in TcAAAP069 and GFP parasites. Overexpression of TcAAAP069 produced a significant increase on the epimastigotes resistance to both, hydrogen peroxide and nitric oxide ( $IC_{50}$ s: 136.6  $\mu$ M and 94.7  $\mu$ M  $H_2O_2$ ; 1135  $\mu$ M and 535.6  $\mu$ M  $NO^+$ , for TcAAAP069 and GFP cells, respectively. P values < 0.0001) (Figures 4A and B). Accordingly, TcAAAP069 overexpression also increased resistance to hydrogen peroxide in *T. cruzi* Y strain parasites ( $IC_{50}$ s: 146.2  $\mu$ M and 123.6  $\mu$ M  $H_2O_2$ ; for TcAAAP069 and GFP cells, respectively. P value = 0.0003) (Supplementary Figure S1C).

Finally, the only trypanocidal drugs available for Chagas disease treatment at the present time, nifurtimox and benznidazole, were also assayed. Again, TcAAAP069 epimastigotes had a significant increased resistance ( $IC_{50}$ s: 4.63  $\mu$ M and 2.06  $\mu$ M nifurtimox; 15.08  $\mu$ M and 9  $\mu$ M benznidazole, for TcAAAP069 and GFP cells, respectively. P values < 0.0001) (Figures 4C and D). Together, these results suggest that proline itself is a fundamental cell defense under a wide variety of adverse conditions.

Since proline itself could trigger a cell stress response by increasing oxidative phosphorylation, the enzyme arginine kinase (E.C. 2.7.3.3) was used as a control of stress response proteins. Previous works [31,32,33] showed that arginine kinase expression increases during stress conditions, such as nutritional, pH and oxidative stresses. The enzyme expression was measured by Western Blot analysis using samples from TcAAAP069 and GFP parasites, and no differences were observed (Supplementary Figure 2C).

### Subcellular localization of TcAAAP069

Previous reports from our group indicate that other *T. cruzi* permeases from the TcAAAP family, such as the lysine and arginine permeases, and also putrescine-cadaverine transporter, are located, as well-defined structures, close to the flagellar pocket, probably associated to the contractile vacuole complex [16,18,34]. To determine whether TcAAAP069 has a similar localization to



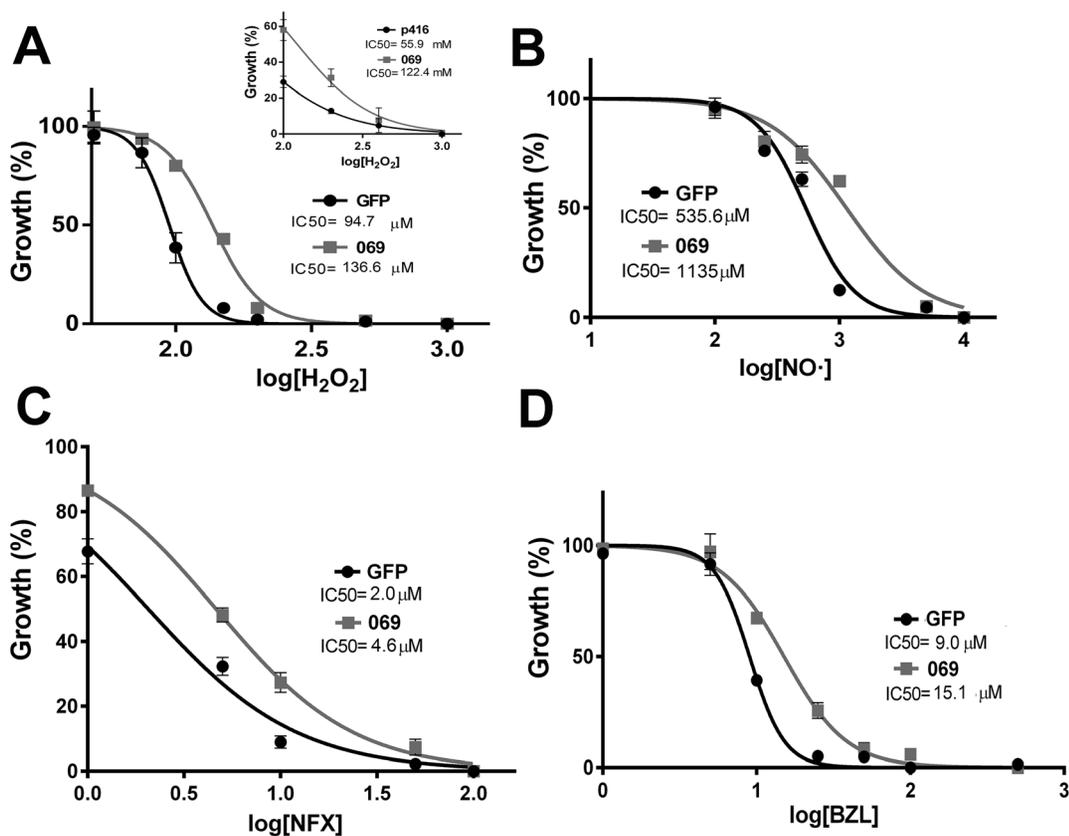
**Figure 3. Transport inhibition assays.** A) L-proline (1 mM) transport assays were performed in the presence of 10 mM of: L-proline (L-pro; 10-fold isotopic dilution), D-proline (D-pro), the proline analogue L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), the non-proteinogenic amino acid hydroxyproline (HYP) and alanine (Ala, gray bar). B) Kinetic analysis of L-proline uptake was performed using different concentrations of L-proline (from 0 to 5 mM) in the presence (+ D-Proline, black line ●), or absence of D-proline 10 mM (- D-Proline, gray line ■). The Lineweaver-Burk plot is shown as an inset. Data were fitted using GraphPad Prism 6 software. doi:10.1371/journal.pone.0092028.g003

the mentioned permeases, genetics constructions containing the TcAAAP069 gene fused to GFP or mCherry were made. In addition, TcBilbo1 was fused to GFP and used as a marker of the flagellar pocket's collar, which demarcates a subdomain structure in the boundary of the flagellar pocket [16,35]. After parasites transfection, TcAAAP069 fluorescence was mainly localized close to the flagellar pocket in a single focus but not colocalized with TcBilbo1 (Figure 5A). Similar results were obtained using the acidocalcisomes and contractile vacuole marker, aquaporin (TcAQP) fused to mCherry [36]; no colocalization between both proteins could be detected (Figure 5B). In addition, in a minor fraction of parasites TcAAAP069 was also located in the plasma membrane (Data not shown).

The fact that TcAAAP069 was found in the same cell region that the lysine, arginine and polyamine transporters suggests that probably all members of TcAAAP family could be concentrated in a unique region of interchange with the extracellular medium.

## Discussion

Along the life cycle, *Trypanosoma cruzi* must endure different extracellular conditions in the insect gut, the mammalian blood stream and also cell cytoplasm, presenting evolutionary adaptations to such environments [37,38]. Among them, transport processes are rapid and efficient mechanisms, in comparison to biosynthetic routes, for supplying metabolites from extracellular media, and also to regulate the first step on many metabolic



**Figure 4. Effect of TcAAAP069 overexpression in stress and drug resistance.** A) About  $3 \times 10^6$  parasites/ml (TcAAAP069 overexpressing parasites: 069, gray line ■, and GFP controls: GFP, black line ●) were incubated with hydrogen peroxide at different concentrations from 0 to 1000 μM and counted 48 hours after treatment. IC<sub>50</sub>s were 136.6 μM and 94.7 μM for 069 and GFP, respectively. Yeast from the strain MG266 transformed with the plasmid p416-TcAAAP069 (069; gray line ■) or an empty p416 control (p416; black line ●), were grown in YPD medium. Aliquots of about 1 OD were subjected to a treatment with hydrogen peroxide at different concentration from 0 to 1000 mM and counted 48 h after treatment (inset). IC<sub>50</sub>s were 122.4 mM and 55.9 mM for 069 and p416, respectively. B) The same parasites' groups used at point A) were incubated with diethylamine NONOate (a nitric oxide donor) at different concentrations from 0 to 10 mM and counted 48 hours after treatment. IC<sub>50</sub>s were 1135 μM and 535.6 μM for 069 and GFP, respectively. C) The same parasites' groups used at point A) were incubated with nifurtimox at different concentrations from 0 to 100 μM and counted 48 hours after treatment. IC<sub>50</sub>s were 4.6 μM and 2 μM for 069 and GFP, respectively. D) The same parasites' groups used at point A) were incubated with benznidazole at different concentrations from 0 to 1000 μM and counted 48 hours after treatment. IC<sub>50</sub>s were 15.1 μM and 9 μM for 069 and GFP, respectively. All the curves were adjusted using GraphPad Prism 6 software. doi:10.1371/journal.pone.0092028.g004

pathways. The proline transporter described in this work belongs to one of the major amino acid transporter families in trypanosomatids called TcAAAP [39], of which several members were already identified by our group [14]. This *T. cruzi* family of transporters comprises at least 36 genes coding for proteins with lengths of 400–500 amino acids and 10–12 predicted transmembrane  $\alpha$ -helical spanners. One remarkable feature of these transporters is that they are absent in mammals [14].

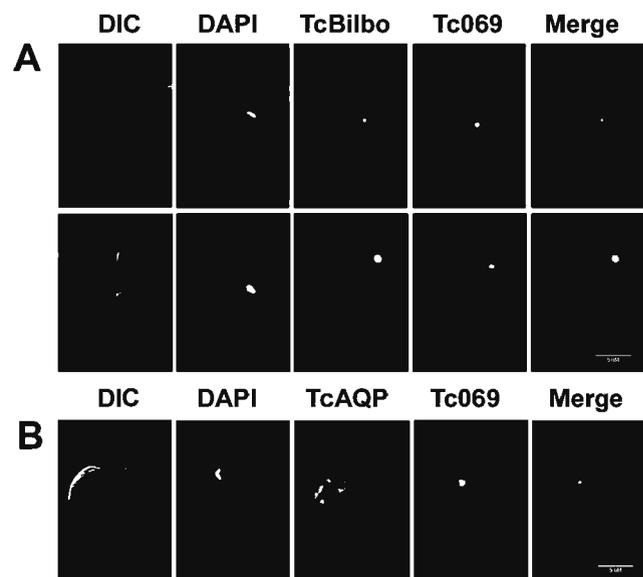
In *T. cruzi*, two active proline transport systems were biochemically characterized [2]. All results herein presented, suggest that TcAAAP069 is the protein responsible for the transport systems described by Silber et al. However, considering the kinetics parameters ( $K_m$ ), TcAAAP069 is similar to system A, but its substrate specificity remains the system B [2]. These data open the possibility of a dual transport system, with different properties according the extracellular conditions, mediated by the same transporter.

Recently, a bi-specific proline-alanine transporter has been identified in *Leishmania donovani* (LdAAP24) which is the homologue gene of TcAAAP069 [12]. However, both transporters differs in some relevant biochemical properties, such as substrate specificity,

and also the subcellular localization. While TcAAAP069 is located in a defined structure close to the flagellar pocket, LdAAP24 is uniformly distributed along the plasma membrane. It was also reported that LdAAP24 is the sole supplier, not only of intracellular proline, but also of alanine. Both amino acids play a critical role under osmotic stress conditions [12].

One interesting result herein presented, is the lack of stereospecificity of the proline transporter, D-proline was able to strongly decrease L-proline uptake with competitive inhibition kinetics. This feature represents a difference with the previous biochemical characterizations of proline transport systems, suggesting that TcAAAP069 is capable of transporting L and D-proline [2]. But some questions arise about the physiological role of a D-proline permease and the directionality of this transport. During infection of mammalian hosts, parasites secrete a proline racemase that contributes to parasite immune evasion [9]. *T. cruzi* proline racemases are encoded by two paralogous genes, one isoform is secreted and the other acts inside the cell [40]. One hypothesis is that extracellular L-proline is transported and “sequestered” by the parasites as D-proline to avoid being incorporated and consumed by host cells. Then, into the parasites'





**Figure 5. Subcellular localization of TcAAAP069.** A) Parasites co-transfected with the pTREX-TcAAAP069:mCherry and pTREX-Bilbo1:eGFP were analyzed by fluorescence microscopy. Differential interference contrast (DIC), DAPI, TcBilbo (flagellar pocket marker), Tc069 and the merged image (Merge) are shown in the indicated columns. B) A similar analysis as in (A) was performed but using the acidocalcisomes and contractile vacuole marker aquaporin (TcAQP) instead of TcBilbo. Parasites co-transfected with the pTREX-TcAAAP069:eGFP and pTREX-TcAQP:mCherry were analyzed by fluorescence microscopy. White bars in the left corner of the merged images represent 5  $\mu$ M.

doi:10.1371/journal.pone.0092028.g005

cytoplasm, D-proline is re-converted to its L- enantiomer and metabolized. Other possibility is that D-proline is incorporated in peptides or acts as an extra- or intracellular signal [11].

As previously mentioned, proline is a key metabolite involved in energy production and osmoregulation, however, its protective role under oxidative stress conditions was poorly studied. Previous evidences demonstrated that proline is a free radical scavenger *in vitro* [29]; it also modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress [41]. In addition, a recent work showed that overexpression of *T. cruzi* proline dehydrogenase in a yeast model produces a decrease, not only in the intracellular proline concentration, but also in the resistance to hydrogen peroxide [5]. Here it was demonstrated that an increased proline concentration enhances protection against radical oxygen species generated not only by hydrogen peroxide but also by nitric oxide. Those are conditions to which the parasites are exposed permanently in its natural environment. In addition, TcAAAP069 transfected parasites presented an increased resistance to available trypanocidal drugs, nifurtimox and benznidazole, probably by affecting its mechanism of action involving oxidative stress. Interestingly, the *T. brucei* orthologue, TbAAT6 (GeneDB ID: Tb927.8.5450), besides proline, it is

## References

- Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N (2009) Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect Immun* 77: 3023–3032.
- Silber AM, Tonelli RR, Martinelli M, Colli W, Alves MJ (2002) Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol* 49: 441–446.
- Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA (2005) Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord* 5: 53–64.

capable to transport the trypanocidal drug eflornithine (difluoromethyl ornithine) and mutations in this gene are sufficient to generate resistance [42]. These results could be relevant in terms of the effectiveness of treatments for Chagas disease, as the currently used drugs act, at least in part, by generating free radicals. Taken together, these data suggest that amino acid transporters may provide multiple, unexplored targets and gateways for therapeutic drugs.

## Supporting Information

**Figure S1 Expression of TcAAAP069 and parasites' growth kinetics.** A) Western blot analysis of TcAAAP069 expression was performed using two different *T. cruzi* strains overexpressing the TcAAAP069 gene: MJ Levin (DTU *T. cruzi* I) and Y (DTU *T. cruzi* II). Arrows on the left indicates the position of the 58 and 46 kDa molecular weight marker, and on the right, the position of the TcAAAP069 band duplex. B) Growth curves were calculated during 15 days from control (GFP; black line) and TcAAAP069 (069; grey line) MJ Levin strain epimastigotes. (PDF)

**Figure S2 TcAAAP069 expression in Y strain and oxidative stress control.** A) Comparative proline transport (left panel) and proline concentration (right panel) were measured using GFP and TcAAAP069 transfected parasites. B) Oxidative stress assay using different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was performed using GFP and TcAAAP069 transfected parasites. C) Arginine kinase (AK) expression was analysed by Western Blot as control for oxidative stress assays in samples from GFP and TcAAAP069 transfected parasites. As gel loading control was used the paraflagellar rod protein (PAR). (PDF)

**Supplemental Figure S3 TcAAAP069 sequence analyzes.**

A) Amino acid sequences of 36 members of the TcAAAP family were aligned using the ClustalW method and the phenogram representation was constructed using the TreeView 1.6.6 software. Numbers indicate the sequences groups defined according their amino acid identity. Dark grey box correspond to the proline transporter TcAAAP069 and the putative homologues. B) Putative proline transporters (TcAAAP733, TcAAAP229 and TcAAAP069) were aligned using the ClustalW method. Identical and equivalent residues were indicated as gray boxes. C) The sequences of TcAAAP069 (069) and TcAAAP733 (733) were analyzed for the presence of transmembrane spans using three different algorithms and topologies were schematized using the TMRPres2D software. The lower scheme represents a comparison of both transporters by overlapping their structures (overlap). (PDF)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CAP MRM. Performed the experiments: MS FD MMC MRM. Analyzed the data: MS MRM. Wrote the paper: CAP.

6. Krishnan N, Dickman MB, Becker DF (2008) Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 44: 671–681.
7. Natarajan SK, Zhu W, Liang X, Zhang L, Demers AJ, et al. (2012) Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. *Free Radic Biol Med* 53: 1181–1191.
8. Rohloff P, Rodrigues CO, Docampo R (2003) Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Mol Biochem Parasitol* 126: 219–230.
9. Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, et al. (2000) A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med* 6: 890–897.
10. Coutinho L, Ferreira MA, Cosson A, Batista MM, Batista Dda G, et al. (2009) Inhibition of *Trypanosoma cruzi* proline racemase affects host-parasite interactions and the outcome of in vitro infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1055–1062.
11. Coatnoan N, Berneman A, Chamond N, Minoprio P (2009) Proline racemases: insights into *Trypanosoma cruzi* peptides containing D-proline. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 295–300.
12. Inbar E, Schlisselberg D, Suter Grottemeyer M, Rentsch D, Zilberstein D (2013) A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses. *Biochem J* 449: 555–566.
13. Magdalenho A, Ahn IY, Paes LS, Silber AM (2009) Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 4: e4534. Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0004534>
14. Bouvier LA, Silber AM, Galvao Lopes C, Canepa GE, Miranda MR, et al. (2004) Post genomic analysis of permeases from the amino acid/auxin family in protozoan parasites. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 547–556.
15. Akerman M, Shaked-Mishan P, Mazareb S, Volpin H, Zilberstein D (2004) Novel motifs in amino acid permease genes from *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 353–366.
16. Miranda MR, Saye M, Bouvier LA, Camara Mde L, Montserrat J, et al. (2012) Cationic amino acid uptake constitutes a metabolic regulation mechanism and occurs in the flagellar pocket of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 7: e32760. Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0032760>
17. Shaked-Mishan P, Suter-Grottemeyer M, Yoel-Almagor T, Holland N, Zilberstein D, et al. (2006) A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Mol Microbiol* 60: 30–38.
18. Inbar E, Canepa GE, Carrillo C, Glaser F, Suter Grottemeyer M, et al. (2012) Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. *Amino Acids* 42: 347–360.
19. Carrillo C, Canepa GE, Giacometti A, Bouvier LA, Miranda MR, et al. (2010) *Trypanosoma cruzi* amino acid transporter TcAAP411 mediates arginine uptake in yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 306: 97–102.
20. Camargo EP (1964) Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6: 93–100.
21. Vissers S, Andre B, Muyldermans F, Grenson M (1989) Positive and negative regulatory elements control the expression of the UGA4 gene coding for the inducible 4-aminobutyric-acid-specific permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 181: 357–361.
22. Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350: 87–96.
23. Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Flawia MM, Torres HN (1999) L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol* 46: 566–570.
24. Vazquez MP, Levin MJ (1999) Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* 239: 217–225.
25. Troll W, Lindsley J (1955) A photometric method for the determination of proline. *J Biol Chem* 215: 655–660.
26. Hirokawa T, Boon-Chiang S, Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14: 378–379.
27. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567–580.
28. Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM (2008) Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C R Biol* 331: 433–441.
29. Kaul S, Sharma SS, Mehta IK (2008) Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino Acids* 34: 315–320.
30. Saefel M, Fleischer B, Hoerauf A (2001) Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 69: 2252–2259.
31. Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber AM, Alves MJ, et al. (2003) Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. *FEBS Lett* 554: 201–205.
32. Miranda MR, Canepa GE, Bouvier LA, Pereira CA (2006) *Trypanosoma cruzi*: Oxidative stress induces arginine kinase expression. *Exp Parasitol* 114: 341–344.
33. Voncken F, Gao F, Wadforth C, Harley M, Colasante C (2013) The phosphoarginine energy-buffering system of *trypanosoma brucei* involves multiple arginine kinase isoforms with different subcellular locations. *PLoS One* 8: e65908. Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0065908>
34. Hasne MP, Coppens I, Soysa R, Ullman B (2010) A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* 76: 78–91.
35. Field MC, Carrington M (2009) The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol* 7: 775–786.
36. Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R (2004) A functional aquaporin colocalizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 279: 38673–38682.
37. Brener Z (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 27: 347–382.
38. Kollien AH, Grospietsch T, Kleffmann T, Zerbst-Boroffka I, Schaub GA (2001) Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 47: 739–747.
39. Young GB, Jack DL, Smith DW, Saier MH, Jr. (1999) The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim Biophys Acta* 1415: 306–322.
40. Chamond N, Gregoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, et al. (2003) Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J Biol Chem* 278: 15484–15494.
41. Krishnan N, Becker DF (2006) Oxygen reactivity of PutA from *Helicobacter* species and proline-linked oxidative stress. *J Bacteriol* 188: 1227–1235.
42. Vincent IM, Creek D, Watson DG, Kamleh MA, Woods DJ, et al. (2010) A molecular mechanism for eflornithine resistance in African trypanosomes. *PLoS Pathog* 6: e1001204. Available: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1001204>

## ORIGINAL ARTICLE

***Trypanosoma cruzi* Proline Transport Presents a Cell Density-dependent Regulation**

Melisa Sayé, Mariana R. Miranda, Chantal Reigada &amp; Claudio A. Pereira

Laboratorio de Parasitología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires and CONICET, Buenos Aires, Argentina

**Keywords**

Chagas disease; proline uptake; trypanosomatids.

**Correspondence**C. Pereira, IDIM, Combatientes de Malvinas 3150, (1427) Bs. As., Argentina  
Telephone number: +5411-4514-8701;  
FAX number: +5411-4514-8708;  
e-mail: cpereira@retina.ar

Received: 14 September 2015; revised 30 December 2015; accepted January 3, 2016.

doi:10.1111/jeu.12295

**ABSTRACT**

*Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, uses proline as its main carbon source, essential for parasite growth and stage differentiation in epimastigotes and amastigotes. Since proline is mainly obtained from extracellular medium by transport proteins, in this work we studied the regulation of the *T. cruzi* proline transporter TcAAAP069. Proline uptake and intracellular concentration presented oscillations during epimastigote growth phases, increasing during the early exponential phase (322 pmol/min) and decreasing to undetectable levels during the late exponential phase. Transporter expression rate correlated with proline uptake, and its subcellular localization alternated from both, the plasma membrane and close to the flagellar pocket, when the transport is higher, to only the flagellar pocket region, when the transport decreased until proline uptake and TcAAAP069 protein became undetectable at the end of the growth curve. Interestingly, when parasites were treated with conditioned medium or were concentrated to artificially increase the culture density, the proline transport was completely abolished resembling the effects observed in late exponential phase. These data highlight for the first time the existence of a density-associated regulation of relevant physiological processes such as proline metabolism.

CHAGAS disease or American trypanosomiasis is the result of human infection by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). Along the life cycle, this parasite is exposed to different environments in the gut of the insect vectors, the bloodstream of the mammalian hosts, and also within different cell types. The availability of nutrients in these dissimilar environments determines the need for complex metabolic adaptations. Energy production in several stages of this parasite is based mainly on the consumption of carbohydrates and amino acids, essentially proline, which is abundant in the gut of the insect vector and can be metabolized through the Krebs cycle (Bringaud et al. 2012; Cazzulo 1994; Sylvester and Krassner 1976). In addition to its relevant role in metacyclogenesis (Contreras et al. 1985; Homsey et al. 1989), proline is also important during life cycle, for host cells infection, and intracellular differentiation (Martins et al. 2009; Silber et al. 2009; Tonelli et al. 2004).

Transporters are in contact with extracellular molecules and work, not only as permeases carrying the solutes into

the cell but also as environmental sensors. The transport of metabolites represents the first step of many metabolic routes and may also regulate such processes (Silber et al. 2005).

The only amino acid transporter family identified in kinetoplastids is the AAAP (Amino Acid/Auxin Permease; TC 2.A.18), one of the major transporter families of the APC (amino acid/polyamine/organocation) superfamily (Bouvier et al. 2004). Some permeases of the AAAP family transport specific amino acids, while others have a very broad specificity for all twenty amino acids, including D-isomers (Young et al. 1999). This gene family has been characterized in *Trypanosoma cruzi* by our group (Bouvier et al. 2004), and the function of many of these transporters was studied (Carrillo et al. 2010; Inbar et al. 2012; Miranda et al. 2012; Saye et al. 2014). Previous works showed that L-proline is transported from the extracellular media through two different active transport systems (Silber et al. 2002), and recently, a D-L-proline transporter (TcAAAP069) was identified in *T. cruzi* (Saye et al. 2014).

A higher intracellular proline concentration, produced by the overexpression of TcAAAP069, causes an improved resistance to trypanocidal drugs (benznidazol and nifurtimox) and also to reactive oxygen species including hydrogen peroxide and nitric oxide, emulating some natural physiological situations. In addition, an increased proline concentration also generates a higher amount of ATP in the transgenic parasites (Sayé et al. 2014). On the other side, *T. cruzi* parasites with reduced intracellular proline levels are more sensitive to oxidative imbalance (Paes et al. 2013), and cell viability and nutrient stress resistance are negatively affected in the presence of proline analog T4C (L-thiazolidine-4-carboxylic acid) (Magdaleno et al. 2009). Many essential processes involving proline have been reported in *T. cruzi*. For example, the metabolic pathway in which L-proline is oxidized to pyrroline-5-carboxylate by a mitochondrial proline dehydrogenase regulating the redox state of the cell and the respiratory metabolism (Mantilla et al. 2015; Paes et al. 2013). Finally, proline transport and associated processes have been thoroughly studied in other trypanosomatids such as *T. brucei*, *Leishmania* spp., *Crithidia*, and *Phytomonas* (Canepa et al. 2007; Galvez Rojas et al. 2008; L'Hostis et al. 1993; Law and Mukkada 1979). In these organisms, proline has been shown to play critical roles in osmoregulation, drug resistance, and amino acid homeostasis (Bringaud et al. 2012).

Considering the importance of proline in many critical processes as is the case of drug resistance, energy metabolism, and progression of parasite life cycle; in the present study, we explored the regulation mechanisms of proline transport in *Trypanosoma cruzi*.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell cultures

Epimastigotes of the Y strain were cultured at 28 °C in plastic flasks (25 cm<sup>2</sup>), containing 5 ml of BHT medium (started with 5 × 10<sup>6</sup> parasites per milliliter) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Camargo 1964). Cells were counted using a hemocytometer. Viability assays were performed using "Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)" (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer instructions.

Conditioned medium was obtained from day 15 parasite culture. Briefly, culture was centrifuged at 3,000 *g* for 10 min and the supernatant was carefully separated and used as conditioned medium.

### Proline transport assays

Aliquots of epimastigote cultures (10<sup>7</sup> parasites) were centrifuged at 8,000 *g* for 30 s, and washed once with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were resuspended in 0.1 ml PBS and then 0.1 ml of the transport mixture was added containing 1 mM L-(<sup>3</sup>H) proline (0.4 µCi, PerkinElmer's NEN<sup>®</sup>; Radiochemicals, Waltham, MA) followed by incubation at 28 °C. Reaction was stopped by adding 1 ml

of ice-cold PBS. Cells were centrifuged as indicated above, and washed twice with ice-cold PBS. Cell pellets were resuspended in 0.2 ml of water and counted for radioactivity in UltimaGold XR liquid scintillation cocktail (Packard Instrument Co., Meriden, CO) (Pereira et al. 1999). Assays were run at least by triplicate. Cell viability was assessed by direct microscopic examination. Non-specific uptake and carry-over were measured in transport mixture at T<sub>0</sub>, or incubated at 4 °C. Transport assays were performed when uptake activity starts to be detectable, after day 4 of parasite culture.

### Plasmid constructions and parasite transfection

TcAAAP069 (GeneDB: TcCLB.504069.120) was amplified using genomic *T. cruzi* DNA as template. Amplification product was subcloned into a modified pTREX (Vazquez and Levin 1999) expression plasmid called pTREXL (Bouvier et al. 2013) and fused with the tri-FLAG epitope (tF-TcAAAP069). Constructions were transfected into *T. cruzi* epimastigotes as follows. 10<sup>8</sup> parasites grown at 28 °C in BHT medium were harvested by centrifugation, washed with PBS, and resuspended in 0.35 ml of electroporation buffer (PBS containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>). This cell suspension was mixed with 50 µg of plasmid DNA in 0.2 cm gap cuvettes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The parasites were electroporated using a single pulse of 400 V, 500 µF with a time constant of about 5 ms.

### Proline determinations

Measurements of proline concentration were adapted from the ninhydrin colorimetric reaction (Bates 1973). Briefly, 10<sup>7</sup> parasites were washed with PBS, resuspended in Tris-HCl 100 mM pH 7.0 and then ruptured by sonication. The supernatant was treated with 5% TCA for an hour at 4 °C. The new supernatant was mixed with ninhydrin acidic solution (0.25 g ninhydrin dissolved in 6 ml glacial acetic acid and 4 ml phosphoric acid 6 M) and glacial acetic acid and then incubated for an hour at 100 °C. The reaction was stopped in ice, followed by toluene addition and thorough mix. The organic phase was recovered in a new tube and measured at 520 nm.

### Fluorescence microscopy

Epimastigote samples were washed twice with PBS. After letting the cells settle for 30 min at room temperature onto poly-L-lysine coated coverslips, parasites were fixed at room temperature for 20 min with 4% formaldehyde in PBS, followed by a cold methanol treatment for 5 min. Slides were incubated for 45 min with anti-tri-FLAG monoclonal antibody produced in mouse (Catalog Number F1804; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluted 1:200, or in combination with the anti-TCLP1 antibody diluted 1:50. Slides were washed and incubated with anti-mouse IgG with fluorophore Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 polyclonal antibody or in combination with anti-rabbit IgG with fluorophore Alexa

Fluor<sup>®</sup> 594 made in goat (catalog numbers ab150113 and ab150080; Abcam, Cambridge, UK), both diluted 1:500. Slides were mounted using Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Cells were observed in an Olympus BX60 fluorescence microscope. Images were recorded with an Olympus XM10 camera.

### Western blot analysis

Western blots were performed using total parasite extracts fractionated by electrophoresis in polyacrylamide denaturing gels and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. The PVDF membranes were treated for 1 h with 5% nonfat dry milk in PBS and incubated overnight with the anti-tri-FLAG monoclonal antibody produced in mouse (Catalog Number F1804; Sigma-Aldrich) diluted 1:4,000. Membranes were washed and incubated with the secondary antibody for 2 h (anti-mouse HRP made in horse diluted 1:2,500, catalog number PI-2000; Vector Laboratories). Detection was done by chemiluminescence (SuperSignal<sup>™</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate, product number 34080; Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Total protein Ponceau S-staining was used for sample normalization.

### Flow cytometry analysis

A total of  $1 \times 10^7$  parasites were washed in PBS and fixed with 500  $\mu$ l of 70% ethanol in PBS at 4 °C overnight. Then, fixed parasites were washed again with PBS and incubated for 30 min at 37 °C with 500  $\mu$ l of PI staining solution (2 mM EDTA, 10 mg/ml DNase-free RNaseA, and 20 mg/ml Propidium Iodide in PBS). Samples were processed in a flow cytometer (FACSAria II; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and results were analyzed using the FlowJo software. Fluorescence intensity, which is proportional to the DNA content present in parasite populations, was plotted against cell count for each point to monitor the progression of cell cycle. Experiments were carried out in triplicate.

## RESULTS

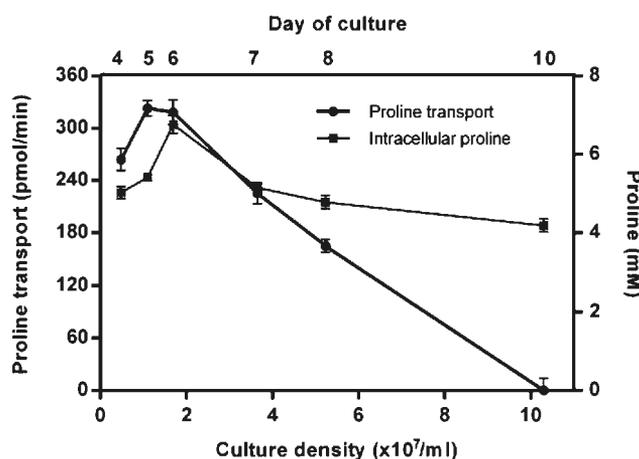
### Variations of proline transport along the parasites' growth curve

Preliminary observations suggested that proline transport is tightly regulated during growth of epimastigote culture. When transport was evaluated using stationary phase parasites proline uptake was undetectable (Sayé et al. unpublished data). These data were the starting point to begin studying the proline uptake at different stages of the growth curve using transgenic parasites overexpressing the proline transporter *TcAAAP069* fused with the tri-FLAG epitope (tF-*TcAAAP069*). Under standard culture conditions, epimastigotes had a first phase of growth up to day 6 (d6) and a second phase from d6 to d10, increasing the parasite densities from  $0.5 \times 10^7$  parasites/ml per day ( $R^2 = 0.97$ ) to  $2.15 \times 10^7$  cells/ml per day ( $R^2 = 0.99$ ,

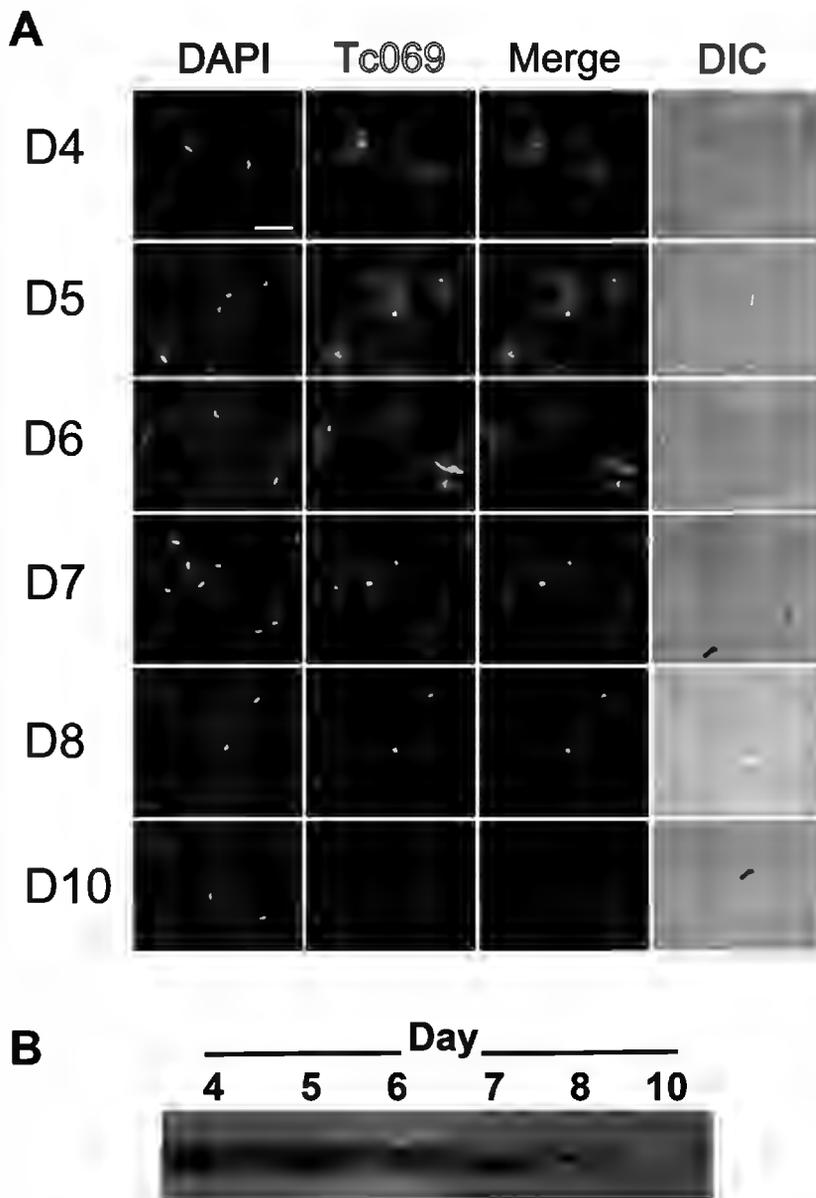
Fig. S1). Proline transport rates were determined at different parasite densities during the growth curve. After a culture passage, during the first 5 d of culture, the proline transport dramatically increased from undetectable levels up to 264 pmol/min on d4 and reaching the maximum value of 322 pmol/min at d5. From d6 to d10 proline transport constantly decreased until it was completely abolished (Fig. 1, black line). This seems to represent an oscillation of transport rates during the culture passages, between 0 and 322 pmol/min.

Since compensatory mechanisms could exist, variations in proline transport activity do not necessarily imply differences in this amino acid intracellular level. To establish whether or not the amount of intracellular proline correlates with transport rates along the culture progression, proline determinations were made simultaneously with transport assays. Interestingly, the maximum proline concentration was found at slightly higher parasite densities than those found for maximum transport rates. In addition, when transport rates decreased to undetectable levels, proline concentration was diminished from 6.8 mM on d6 to 4.2 mM on d10 and remained constant up to the next culture passage (Fig. 1, gray line). To evaluate how proline availability varies during the growth curve of epimastigotes, extracellular proline concentration was quantified in samples of fresh culture medium and medium obtained from parasites of d15 culture. No significant differences were observed between both groups, and corresponded to 5 mM ( $\pm 0.5$ ) and 4.7 mM ( $\pm 0.4$ ), respectively.

Expression analysis by immunofluorescence revealed that *TcAAAP069* is expressed from d4 to d8, and after that it was undetectable (Fig. 2A). Throughout this period of time, the transporter was located close to the flagellar pocket, as previously described (Inbar et al. 2012; Miranda et al. 2012; Sayé et al. 2014), and it was also detected in the plasma membrane on d4, d5 and d6. Results obtained



**Figure 1** Proline flow dynamics in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Proline uptake (circle, black line) and intracellular proline concentration (square, gray line) were measured from epimastigote cultures from d4 to d10 (upper X-axis) as stated under "Materials and Methods". The corresponding parasites densities are also indicated in the graphic (lower X-axis). All uptake assays were performed using  $10^7$  parasites.



**Figure 2** Regulation of expression of the proline permease TcAAAP069. **(A)** Parasites transfected with the plasmid pTREXL containing the full length TcAAAP069 gene fused to the tri-FLAG epitope (tF-TcAAAP069) were analyzed by indirect immunofluorescence using anti-tri-FLAG antibodies (green) and DAPI (blue). Each row represents 1 d of culture (e.g. D4 = day 4). Scale bar = 10  $\mu$ m. **(B)** Transgenic epimastigote samples from different days were analyzed by Western Blot using anti tri-FLAG antibodies. Loading control was performed by total protein staining using Ponceau S and further quantitation using the ImageJ program (National Institute of Health, Bethesda, MD).

by Western Blot analysis using anti-tri-FLAG antibodies correlated with proline transport activity and immunofluorescence data. The transporter *TcAAAP069* expression decreased along the growth curve and was undetectable since d8 (Fig. 2B). We also evaluated colocalization with TCLP1 (Trypanosomatid CesT-like Protein 1) which is a *T. cruzi* protein that localizes predominantly to the intracellular portion of the flagellar pocket area, and it might be associated with endocytic processes (Durante et al. 2015). No colocalization was detected throughout the growth curve (Fig. S2).

To test if proline uptake or *TcAAAP069* expression were undetectable after d8 due to an unrelated phenomenon, parasites viability was evaluated using a vital stain; d10 Tc069 parasites and wild type controls did not present significant differences ( $73\% \pm 7$  and  $68\% \pm 10$ ). As an additional control, flow cytometry analysis revealed that there was no cell cycle arrest of Tc069 parasites along the exponential phase of growth, nor differences in cells size (Fig. S3). These results suggest that the observed lack of proline transport is not a consequence of a decreased cell metabolism or a cell cycle arrest.

To validate the transgenic model, the regulation of proline transport activity and intracellular proline concentration were studied in wild type parasites. The obtained curves for both parameters presented shapes similar to those obtained for transgenic parasites.

### Regulation of proline transport

To identify the factors involved in the modulation of proline uptake the first step was to evaluate the possible regulation by substrate availability. Proline transport was measured in parasites incubated 24 h in PBS only, PBS supplemented with 10 mM proline, and as control PBS supplemented with 10 mM lysine, an unrelated amino acid. Cell viability was evaluated using a vital stain; parasites starved 24 h in PBS and controls did not present significant differences ( $97\% \pm 0.4$  and  $100\% \pm 0.9$ , respectively). Whereas proline is an important energy source and its transport is energy-dependent (Silber et al. 2002), uptake was also compared with parasites incubated with PBS supplemented with 10 mM glucose. After incubation in PBS-proline or PBS-glucose, proline uptake velocity presented a significant increase of 2.9-fold ( $\pm 0.28$ ) compared with parasites incubated in PBS-lysine or PBS-alone ( $p < 0.0001$ ) (Fig. S4). No significant differences were found between PBS-proline vs. PBS-glucose and PBS-lysine vs. PBS only. These results support the hypothesis that either proline or glucose provides the energy needed for proline uptake without specifically regulating the transport.

To check whether a medium component might influence somehow proline uptake, epimastigote cultures from d5 ( $10^7$  parasites/ml) were switched to the following culture conditions: (a) fresh medium, (b) conditioned medium obtained from d15 parasites, and (c) control group without treatment. Then, proline uptake was evaluated periodically during 6 d. After 24 h, proline transport rates of groups A and C showed a slight increase while in the group B transport decreased three times (Fig. 3A). These results demonstrated the effect of conditioned medium components over the proline transport. Group B reached the minimum transport rate at d3 after treatment while in groups A and C transport rates decreased continuously until d6. As stated above, no significant differences in extracellular proline concentration were observed between the mentioned culture media.

Considering the obtained results, we hypothesize that regulation of proline uptake by medium components could be mediated by an unknown parasite density-derived factor. To preliminary test this hypothesis, parasites from d5 were assayed for proline uptake in two cell densities,  $10^7$  parasites/ml (density reached at d5) for the control, and  $7 \times 10^7$  parasites/ml (high-density, equivalent to a d8 culture). It is important to note that both groups, control and high-density, were resuspended in fresh medium. In concordance with the prior experiment, after 24 h the proline transport rate of control group remained constant, while in the concentrated parasites it decreased three times (Fig. 3B). High-density culture reached the minimum trans-

port rate at d2 after treatment while in control group transport rates decreased continuously until d6. Interestingly, in control parasites the proline transport rate at d6 after treatment was slightly lower than that presented at d1 for concentrated parasites ( $65.3 \pm 6.6$  and  $87.5 \pm 7.7$  pmol/min, respectively) and the culture densities at those days after treatment were similar ( $1.3 \times 10^8$  and  $1.82 \times 10^8$  parasites/ml). According to previous data, the depletion of medium components in only 24 h is improbable (Alonso et al. 2001), being the accumulation of some factor dependent on the parasites density a more feasible hypothesis.

### DISCUSSION

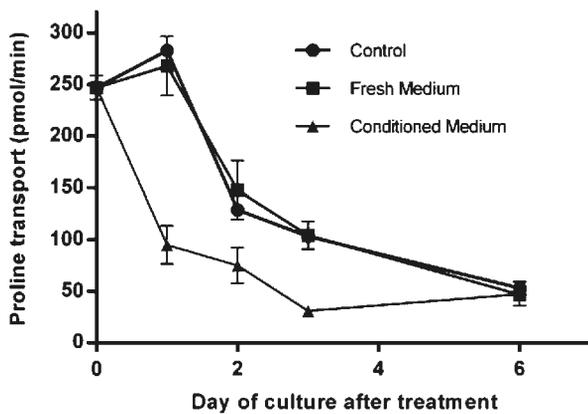
L-proline is the most abundant amino acid in the midgut and haemolymph of trypanosomatids insect vectors (Bringaud et al. 2006), and is oxidized to glutamate in the parasite mitochondria (Mantilla et al. 2015; Paes et al. 2013; Sylvester and Krassner 1976). *Trypanosoma cruzi* is capable to metabolize D-proline since it also contains proline racemases (Chamond et al. 2003). After its conversion into glutamate, part of the proline is fully oxidized through the TCA cycle (Sylvester and Krassner 1976). Our results suggest that intracellular proline is accumulated, as a result of a finely regulated process, prior to increasing the cell replication velocity. The correlative increase of TcAAAP069 protein, transport rate, intracellular proline concentration and finally the cell replication velocity, suggests that parasites accumulate proline prior to the initiation of the exponential growth phase.

Accumulation of free proline is the result of a balance between uptake from the extracellular medium, biosynthesis and degradation. So, it cannot be excluded that the observed changes in the intracellular pool of proline are due not only to an increased transport but also to variations in the metabolism of proline. We can speculate that proline transport regulation occurs to maintain the cell energy or redox homeostasis, both of them, or even the osmotic equilibrium (Magdaleno et al. 2009; Paes et al. 2013; Rohloff et al. 2004; Sayé et al. 2014; Sylvester and Krassner 1976).

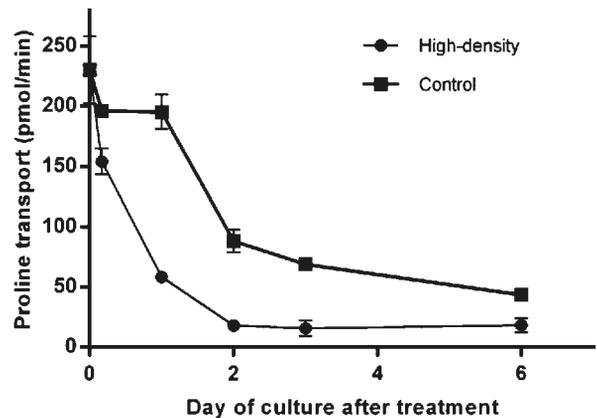
Other interesting finding is the transient localization of the transporter in the plasma membrane, in addition to the previously reported focus close to the flagellar pocket (Inbar et al. 2012; Miranda et al. 2012; Sayé et al. 2014). This localization correlates with maximum transport rates, suggesting the possibility that the proline uptake is more active when TcAAAP069 transporter is located both in the plasma membrane and close to the flagellar pocket. All *T. cruzi* amino acid transporters described up to day were detected in the same focus close to the flagellar pocket, but the presence in the plasma membrane was not reported yet.

Formerly, it was described that proline transport decreases during the passage from intracellular epimastigotes to trypomastigotes (Silber et al. 2009; Tonelli et al. 2004). However, and despite the high proline transport activity, intracellular epimastigotes do not have high levels of intracellular free proline, and they actually have the low-

A



B



**Figure 3** Modulation of proline transport by parasites density related factor. **(A)** Epimastigote cultures from d5 ( $10^7$  parasites/ml) were switched to the following conditions: (1) fresh medium (square), (2) conditioned medium obtained from d15 parasites (triangle), and (3) control group without treatment (circle). Then, proline uptake was evaluated periodically for 6 d. **(B)** Epimastigotes from d5 ( $10^7$  parasites/ml) were assayed for proline transport periodically after dividing the culture into two groups: (1) control group without treatment (square) and (2) parasites concentrated seven times respect to the control, equivalent to a d8 culture density ( $\sim 7 \times 10^7$  parasites/ml, circle). Both groups, control and concentrated, were resuspended in fresh medium.

est levels among the mammalian stages of *T. cruzi* (Silber et al. 2009). Our results showed that epimastigotes, like intracellular epimastigotes, also present high proline transport activity, and this activity decreases during the growth curve until it completely disappears in the late exponential phase, when the epimastigotes are in transition to metacyclic trypomastigotes. Related to the putative regulation mechanisms, post-translational modifications of the TcAAAP069 could produce down-regulation of the transporter, indeed the *T. cruzi* phosphoproteome reported the presence of five phosphorylation positions and also SUMOylation sites (Marchini et al. 2011).

There are many reports about the effects of the conditioned medium over cellular processes in *T. cruzi* epimastigotes, i.e. cell division, metacyclogenesis, arginine kinase expression, arginine transport, aspartate transport, cysteine transport, lysine transport, soluble adenylate kinase activity, and nuclear adenylate kinase localization (Alonso et al. 2001; Bouvier et al. 2006; Camara Mde et al. 2013; Canepa et al. 2005, 2009; de Camara Mde et al. 2013; Inbar et al. 2012; Pereira et al. 2002). In the case of *T. brucei*, the slender to stumpy differentiation is a density-dependent response that resembles quorum sensing in microbial systems (Mony et al. 2014). In this sense, our results about the down-regulation of proline uptake in parasites, growing at high densities or in conditioned medium, suggest the presence of a parasite density-derived factor that can regulate such process. The release of parasite proteins was studied extensively. Parasite-associated extracellular vesicles have been reported and also their contribution to host-pathogen interactions (Twu and Johnson 2014). In the specific case of *T. cruzi*, the presence of different secretion pathways to excrete or secrete proteins has been demonstrated. Moreover, some functions of such vesicles were reported, for example,

metacyclic forms may use extracellular vesicles to deliver cargo into host cells (Bayer-Santos et al. 2013). One or more of these secreted proteins could be responsible for the regulation of proline transport, however, further investigation is needed.

## ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks to Carlos Buscaglia for kindly provided the TCLP1 antibodies, Lic. Fabio di Girolamo (IDIM-CONICET) for technical support, and Lic. Andrés Maped Zalguzuri and Lic. Edward Valera Vera for manuscript revision. This study was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 2011-0263, and 2013-0664), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT PICT 2012-0559 and 2013-2218). CAP and MRM are members of the career of scientific investigator, C.R. and M.S. are research fellows from CONICET.

## LITERATURE CITED

- Alonso, G. D., Pereira, C. A., Remedi, M. S., Paveto, M. C., Cochella, L., Ivaldi, M. S., Gerez de Burgos, N. M., Torres, H. N. & Flavio, M. M. 2001. Arginine kinase of the flagellate protozoa *Trypanosoma cruzi*. Regulation of its expression and catalytic activity. *FEBS Lett.*, 498:22–25.
- Bates, L. S. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39:205–207.
- Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F., Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., da Silveira, J. F. & Almeida, I. C. 2013. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J. Proteome Res.*, 12:883–897.
- Bouvier, L. A., Camara Mde, L., Canepa, G. E., Miranda, M. R. & Pereira, C. A. 2013. Plasmid vectors and molecular building



- blocks for the development of genetic manipulation tools for *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 8:e80217.
- Bouvier, L. A., Miranda, M. R., Canepa, G. E., Alves, M. J. & Pereira, C. A. 2006. An expanded adenylate kinase gene family in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1760:913–921.
- Bouvier, L. A., Silber, A. M., Galvao Lopes, C., Canepa, G. E., Miranda, M. R., Tonelli, R. R., Colli, W., Alves, M. J. & Pereira, C. A. 2004. Post genomic analysis of permeases from the amino acid/auxin family in protozoan parasites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 321:547–556.
- Bringaud, F., Barrett, M. P. & Zilberstein, D. 2012. Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Front Biosci.*, 17:349–374.
- Bringaud, F., Riviere, L. & Coustou, V. 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 149:1–9.
- Camara Mde, L., Bouvier, L. A., Canepa, G. E., Miranda, M. R. & Pereira, C. A. 2013. Molecular and functional characterization of a *Trypanosoma cruzi* nuclear adenylate kinase isoform. *PLoS Negl. Trop Dis.*, 7:e2044.
- de Camara Mde, L., Bouvier, L. A., Miranda, M. R., Reigada, C. & Pereira, C. A. 2013. Laboratory techniques to obtain different forms of *Trypanosoma cruzi*: applications to wild-type and genetically modified parasites. *Folia Parasitol. (Praha)*, 60:406–410.
- Camargo, E. P. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 6:93–100.
- Canepa, G. E., Bouvier, L. A., Miranda, M. R., Uttaro, A. D. & Pereira, C. A. 2009. Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 292:27–32.
- Canepa, G. E., Bouvier, L. A., Urias, U., Miranda, M. R., Colli, W., Alves, M. J. & Pereira, C. A. 2005. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 247:65–71.
- Canepa, G. E., Carrillo, C., Armesto, A. R., Bouvier, L. A., Miranda, M. R. & Pereira, C. A. 2007. Phytomonas: transport of amino acids, hexoses and polyamines. *Exp. Parasitol.*, 117:106–110.
- Carrillo, C., Canepa, G. E., Giacometti, A., Bouvier, L. A., Miranda, M. R., de los Milagros Camara, M. & Pereira, C. A. 2010. *Trypanosoma cruzi* amino acid transporter TcAAP411 mediates arginine uptake in yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 306:97–102.
- Cazzulo, J. J. 1994. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 26:157–165.
- Chagas, C. 1909. Nova Tripanosomíaze Humana: Estudos sobre amorfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1:159–218.
- Chamond, N., Gregoire, C., Coatnoan, N., Rougeot, C., Freitas-Junior, L. H., da Silveira, J. F., Degrave, W. M. & Minoprio, P. 2003. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J. Biol. Chem.*, 278:15484–15494.
- Contreras, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Morel, C. M. & Goldenberg, S. 1985. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16:315–327.
- Durante, I. M., Camara Mde, L. & Buscaglia, C. A. 2015. A novel *Trypanosoma cruzi* protein associated to the flagellar pocket of replicative stages and involved in parasite growth. *PLoS ONE*, 10:e0130099.
- Galvez Rojas, R. L., Frossard, M. L., Machado Motta, M. C. & Silber, A. M. 2008. L-proline uptake in *Crithidia deanei* is influenced by its endosymbiont bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.*, 283:15–22.
- Homsy, J. J., Granger, B. & Krassner, S. M. 1989. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.*, 36:150–153.
- Inbar, E., Canepa, G. E., Carrillo, C., Glaser, F., Suter Grottemeyer, M., Rentsch, D., Zilberstein, D. & Pereira, C. A. 2012. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. *Amino Acids*, 42:347–360.
- Law, S. S. & Mukkada, A. J. 1979. Transport of L-proline and its regulation in *Leishmania tropica* promastigotes. *J. Protozool.*, 26:295–301.
- L'Hostis, C., Geindre, M. & Deshusses, J. 1993. Active transport of L-proline in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* brucei. *Biochem. J.*, 291(Pt 1):297–301.
- Magdaleno, A., Ahn, I. Y., Paes, L. S. & Silber, A. M. 2009. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 4:e4534.
- Mantilla, B. S., Paes, L. S., Pral, E. M., Martil, D. E., Thiemann, O. H., Fernandez-Silva, P., Bastos, E. L. & Silber, A. M. 2015. Role of Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, 290:7767–7790.
- Marchini, F. K., de Godoy, L. M., Rampazzo, R. C., Pavoni, D. P., Probst, C. M., Gnad, F., Mann, M. & Krieger, M. A. 2011. Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. *PLoS ONE*, 6:e25381.
- Martins, R. M., Covarrubias, C., Rojas, R. G., Silber, A. M. & Yoshida, N. 2009. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect. Immun.*, 77:3023–3032.
- Miranda, M. R., Saye, M., Bouvier, L. A., Camara Mde, L., Montserrat, J. & Pereira, C. A. 2012. Cationic amino acid uptake constitutes a metabolic regulation mechanism and occurs in the flagellar pocket of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 7:e32760.
- Mony, B. M., MacGregor, P., Ivens, A., Rojas, F., Cowton, A., Young, J., Horn, D. & Matthews, K. 2014. Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, 505:681–685.
- Paes, L. S., Suarez Mantilla, B., Zimbres, F. M., Pral, E. M., Diogo de Melo, P., Tahara, E. B., Kowaltowski, A. J., Elias, M. C. & Silber, A. M. 2013. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 8:e69419.
- Pereira, C. A., Alonso, G. D., Ivaldi, S., Silber, A., Alves, M. J., Bouvier, L. A., Flawia, M. M. & Torres, H. N. 2002. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. *FEBS Lett.*, 526:111–114.
- Pereira, C. A., Alonso, G. D., Paveto, M. C., Flawia, M. M. & Torres, H. N. 1999. L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46:566–570.
- Rohloff, P., Montalvetti, A. & Docampo, R. 2004. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, 279:52270–52281.
- Saye, M., Miranda, M. R., di Girolamo, F., delos Milagros Camara, M. & Pereira, C. A. 2014. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. *PLoS ONE*, 9:e92028.
- Silber, A. M., Colli, W., Ulrich, H., Alves, M. J. & Pereira, C. A. 2005. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 5:53–64.
- Silber, A. M., Tonelli, R. R., Lopes, C. G., Cunha-e-Silva, N., Torrecilhas, A. C., Schumacher, R. I., Colli, W. & Alves, M. J.

2009. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 168:102–108.
- Silber, A. M., Tonelli, R. R., Martinelli, M., Colli, W. & Alves, M. J. 2002. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 49:441–446.
- Sylvestre, D. & Krassner, S. M. 1976. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 55:443–447.
- Tonelli, R. R., Silber, A. M., Almeida-de-Faria, M., Hirata, I. Y., Colli, W. & Alves, M. J. 2004. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.*, 6:733–741.
- Twu, O. & Johnson, P. J. 2014. Parasite extracellular vesicles: mediators of intercellular communication. *PLoS Pathog.*, 10: e1004289.
- Vazquez, M. P. & Levin, M. J. 1999. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene*, 239:217–225.
- Young, G. B., Jack, D. L., Smith, D. W. & Saier Jr, M. H. 1999. The amino acid/auxin: proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta*, 1415:306–322.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Epimastigote growth curve. In vitro growth curve of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes overexpressing

the proline transporter TcAAAP069. To determine the growth rate,  $10^6$  cells/ml were seeded in BHT medium and maintained at 28 °C for 10 d. Parasites were counted using a hemocytometer chamber.

**Figure S2.** Colocalization with TCLP1 protein. *Trypanosoma cruzi* TcAAAP069 parasites of day 5 (D5) and day 8 (D8) were analyzed by indirect immunofluorescence using anti-tri-FLAG (green), anti-TCLP1 (red) antibodies and DAPI (blue). Scale bar = 10  $\mu$ m.

**Figure S3.** Cell cycle and cell size analysis. *Trypanosoma cruzi* TcAAAP069 parasites of day 5 (D5) and day 7 (D7) were analyzed by flow cytometry after iodide propidium staining. **(A)** Cell cycle analysis. The percent of cells in each phase was calculated using FlowJo software. **(B)** Cell size analysis of sample parasites. Dot plot of forward scatter vs. side scatter was used to compare cell size between D5 and D7 parasites. The corresponding histograms are also shown (horizontal for FSC-A and vertical for SSC-A).

**Figure S4.** Proline transport after PBS starvation with or without proline, lysine, or glucose. *Trypanosoma cruzi* TcAAAP069 parasites of day 5 ( $1 \times 10^7$  parasites/ml) were incubated for 24 h in PBS alone (PBS), PBS supplemented with 10 mM proline (PRO), PBS supplemented with 10 mM lysine (LYS) or PBS supplemented with 10 mM glucose (GLUC). Uptake assays were performed using  $10^7$  parasites.