PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES Y CELULARES PARA ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL EN *TRYPANOSOMA CRUZI* MUTANTES POR DELECIÓN DE TSSA.

Burasi, Florencia – LU 1084107

Licenciatura en Biotecnología

Tutores: Balouz, Virginia IIBio, UNSAM-CONICET Buscaglia, Carlos Andrés, IIBio, UNSAM-CONICET

> Co-Tutor: Martinez Tosar, Leandro Julián, UADE.

> > Noviembre, 2022



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS



Agradecimientos:

• A mis papás Claudia y Osvaldo por enseñarme todo lo que sé, acompañarme siempre, apoyarme y ayudarme a lograr todo lo que me propongo. Por esperarme todas las noches, siendo las 23:30 hs., en la parada del colectivo cuando volvía de cursar.

• A mi mamá por ser mi compañera de mates en largas jornadas de estudio, estar siempre que la necesito, comprenderme, escucharme y tener las palabras justas para cada ocasión.

• A mi papá por mencionar aquella vez que existía algo llamado biotecnología y sugerirme que averiguara porque, tal vez, me podría interesar. Por darme sus consejos tan valiosos y útiles al tener tan amplia experiencia y una excelente carrera profesional.

• A mi hermano Luciano por darme una mano siempre que lo necesité y ser partícipe en cierta forma de este trabajo aportando sus conocimientos sobre diseño.

• A Ulises por ser fuente infinita de amor, ser mi compañero y hacerme sentir una persona tan fuerte.

• A mis abuelos María, Cacho, Norma y Jorge por ser todo lo que se supone que un abuelo debe ser y más! Por hacerme sentir tan agradecida de tenerlos. Por estar pendientes de cada examen, desearme todo lo mejor antes de rendir y llamarme para preguntar cómo me fue después.

• A Carlos y Vir por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto y hacer mi Tesina en un lugar tan hermoso como es el IIB. Por introducirme en el mundo de la investigación, enseñarme tanto y permitirme llevar la teoría a la práctica.

• A Mai e Ivi. Su amistad es una de las cosas más valiosas que me llevo del IIB.

• A Mai por su buena energía, ser mi compañera de mesada, estar siempre presente y dispuesta a ayudarme y explicarme todo, como buena profe y amiga que es.

• A mis amigas del secundario: Dai, Euge, Ale y Mica por su amistad indestructible (a pesar de mi ausencia durante época de estudio), por divertirnos tanto y por estar ahí siempre.

• A mis perritos Greta y Milo por haber sido siempre los primeros en venirme a saludar y ponerse tan contentos al verme llegar a casa. Los llevaré siempre en el corazón.



Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han sido incluidos en:

Caracterización fenotípica de mutantes por deleción para TSSA (*Trypomastigote Small Surface Antigen*) de *Trypanosoma cruzi*.

Burasi, F., Cámara, M., Rodriguez, M. E., Tekiel, V., Buscaglia, C. A., Balouz, V. Reunión anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, Argentina, 2020.



Resumen:

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, infección para la cual actualmente no existen vacunas ni tratamientos apropiados y se estima afecta entre 6 y 7 millones de personas en todo el mundo. En este marco, surge como una prioridad en el área la investigación sobre aspectos de la biología básica de este patógeno que puedan conducir a la identificación de nuevos blancos potenciales de intervención.

Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) es una proteína de superficie de *T. cruzi* que presenta polimorfismos entre diferentes cepas del parásito y juega un rol clave en su interacción con el hospedador mamífero. Múltiples ensayos bioquímicos y de sobreexpresión homóloga indican que TSSA es una adhesina involucrada en el reconocimiento entre el tripomastigote sanguíneo y la célula donde éste establece su nicho replicativo. Además, esta funcionalidad parece correlacionar con ciertas isoformas de TSSA.

Usando la técnica de CRISPR-Cas9 se obtuvieron recientemente tres líneas editadas genéticamente en los *loci* de TSSA: los clones 9 y 10, con deleción total y el clon 3 con deleción parcial de estos genes. Evaluaciones fenotípicas de estas líneas resultaron congruentes con estudios previos y señalan a TSSA como un factor clave para el reconocimiento, adhesión e internalización del parásito hacia la célula huésped.

Sin embargo, la implementación de ensayos de complementación funcional permitiría dar una mayor robustez a estos resultados. En este contexto surge el presente trabajo de Tesina, el cual propone como objetivo la generación de las herramientas moleculares necesarias para obtener líneas derivadas de los clones modificados, los cuales poseen expresión constitutiva de la nucleasa Cas9, complementadas con TSSA. Para agregar valor a nuestro trabajo, nos planteamos la complementación de estas líneas con tres isoformas distintas de esta proteína llamadas TSSAI, TSSAII y TSSAIII.

Mediante la incorporación mutaciones y etiquetas antigénicas, se realizó un diseño racional de los genes sintéticos correspondientes a cada una de las isoformas de TSSA. Utilizando técnicas de biología molecular clonamos estos constructos en vectores apropiados, los cuales fueron luego transfectados en formas epimastigotes de las diferentes líneas de parásitos. Distintas evaluaciones inmunoquímicas indicaron que nuestro diseño permitió la correcta expresión y presentación de las proteínas TSSA en la superficie del parásito. Sin embargo, algunas isoformas mostraron patrones electroforéticos diferentes al de la proteína



endógena, lo cual ya había sido reportado previamente, y que posiblemente este asociado a un procesamiento diferencial entre estadios del desarrollo del parásito.

En conjunto, las herramientas moleculares y celulares aquí generadas representan la base para la validación fenotípica de las líneas mutantes de TSSA y permitirán profundizar el conocimiento acerca de este factor de virulencia de *T. cruzi* y del impacto funcional de su variabilidad intrínseca.



Abstract:

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, which is estimated to affect between 6 and 7 million people worldwide and for which there are currently no vaccines or appropriate treatments. In this framework, research on aspects of the basic biology of this pathogen that may lead to the identification of new potential targets of intervention, emerge as a priority in the area.

Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) is a surface protein of *T. cruzi* that presents polymorphisms between different strains of the parasite and plays a key role in its interaction with the mammalian host.

Multiple biochemical and homologous overexpression assays indicate that TSSA is an adhesin involved in the recognition between the blood trypomastigote and the cell, where it establishes its replicative niche. Furthermore, this functionality appears to depend on the TSSA isoform.

Using the CRISPR-Cas9 method, three genetically modified lines for the TSSA *loci* have been recently obtained: clones 9 and 10 with total deletion, and clone 3 with partial deletion for these genes. Phenotypic assays with these lines were consistent with previous studies and pointed to TSSA as a key factor for the recognition, adhesion, and internalization of the parasite towards the host cell.

However, the implementation of functional complementation assays would allow these results to be more robust. In this context, this Thesis work arises, proposing as an objective the generation of molecular tools necessary to obtain lines derived from the modified clones, which have constitutive expression of the Cas9 nuclease, complemented with TSSA. To add value to our work, we proposed complementing these lines with three different isoforms of this protein called TSSAI, TSSAII and TSSAIII.

A design of the synthetic genes corresponding to each of the TSSA isoforms was made by adding mutations and antigenic tags. Using molecular biology techniques, we cloned these constructs into appropriate vectors which were then used to transfect epimastigotes from the different parasite lines. Several immunochemical assessments indicate that our design allowed the correct expression and localization of the TSSA proteins on the parasite's surface. However, some isoforms showed different electrophoretic patterns from those of the



endogenous protein. This characteristic had been previously reported and it is possibly associated with differential processing among different stages of the parasite development.

Together, the molecular and cellular tools generated here represent the basis for the phenotypic validation of the TSSA mutant lines and will expand our knowledge about this *T. cruzi*'s virulence factor and the functional impact of its intrinsic variability.



Índice:

Resumen:		4
Abstract:		6
1. Introduc	eción:	10
1.1. Trip	panosomiasis Americana	10
1.2. Cic	lo de vida de <i>T. cruzi</i> :	11
1.3. Glio	coproteínas de membrana en T. cruzi	12
1.4. Car	acterización funcional de TSSA	14
2. Anteced	entes:	16
2.1. Obt	ención de parásitos editados para el <i>locus</i> TSSA.	16
2.2. Aná	álisis fenotípico de las líneas editadas	18
3. Objetivo	DS:	23
4. Hipótesi	is:	24
5. Material	les y métodos:	25
5.1. Téc	nicas de biología molecular:	25
5.1.1.	Preparación de <i>E. coli</i> DH5αF competentes	25
5.1.2.	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5αF	25
5.1.3.	Condiciones de cultivo bacteriano	26
5.1.4.	Minipreparación estándar de plásmidos	26
5.1.5.	Midipreparación de plásmidos	26
5.1.6.	Cuantificación de ADN plasmídico	28
5.1.7.	Electroforesis de ADN en gel de agarosa	28
5.1.8.	Diseño y obtención de genes sintéticos	28
5.1.10. del vecto	Obtención de oligonucleótidos correspondientes al nuevo MCS y constr or pTEXL	rucción 29
5.1.11.	Digestión enzimática de ADN	29
5.1.12.	Ligación de fragmentos de ADN	30
5.1.13.	Secuenciación de ADN:	30
5.2. Cul	tivos de T. cruzi	30
5.2.1.	Mantenimiento de líneas de epimastigotes establecidas	30
5.2.2.	Transfección de epimastigotes por electroporación	31
5.3. Téc	nicas analíticas de proteínas	32
5.3.1. PAGE)	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante 32	(SDS-



	5.3.2	2. Ensayo de Western Blot por método de quimioluminiscencia	32
	5.3.3	B. Ensayo de Western Blot por fluorescencia en infrarrojo, sistema Odyssey:	33
	5.3.4	Ensayos de Inmunofluorescencia indirecta	33
2 (Fabla l a la qu que fue	II: Se describen las distintas marcaciones realizadas a las muestras, la longitud de or e fueron sometidas, los distintos elementos que fueron observados y los colores en eron visualizados.	ıda los 34
4	5.4. Té	écnicas de análisis in silico	34
	5.4.1	. Análisis bioinformático de secuencias	34
6.	Resu	ltados	35
(5.1. ГSSA	Diseño de un plásmido derivado de pTEXL-EGFP para la expresión de las proteín en <i>T. cruzi</i>	nas 35
6	5.2.	Diseño de genes TSSA sintéticos y construcción del vector de complementación	37
e I	5.3. parásit	Transfección y evaluación de la expresión de las distintas TSSAs en las líneas os editadas con CRISPR-Cas9	de 46
7.	Disc	usión y conclusión	56
8.	Anex	xos:	61
8	3.1.	Anexo 1: Abreviaturas	61
8	8.2. Ar	nexo 2: Composición de soluciones y medios de cultivo	64
	8.1.1	Soluciones:	64
	8.1.2	2. Medios de cultivo:	64
9.	Bibli	iografía:	66



1. Introducción:

1.1. Tripanosomiasis Americana

La Tripanosomiasis Americana, o enfermedad de Chagas, es una afección parasitaria crónica potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi (T. cruzi)*. Esta está incluida dentro de las consideradas enfermedades tropicales desatendidas (*Neglected Tropical Diseases*) (Organización Mundial de la Salud 2021; Schmunis y Yadon, 2010) debido a que su prevención, diagnóstico y tratamiento envuelven problemas de carácter científico y socioeconómico complejos.

A pesar de que la mayoría de los individuos infectados con *T. cruzi* permanecen asintomáticos a lo largo de su vida, se estima que hasta un 30% presenta, con el pasar de los años, trastornos cardíacos como consecuencia de la enfermedad (Organización Mundial de la Salud 2021; Stanaway y Roth, 2015). En estos casos, la infección causa la destrucción del músculo cardíaco y sus inervaciones ocasionando muerte súbita por arritmias o insuficiencia cardíaca. Se han registrado, además, formas digestivas y neurológicas de esta enfermedad en el 10% de los pacientes (Organización Mundial de la Salud 2021; Bern, 2015). Según la Organización Mundial de la Salud (2021), se estima que entre 6 y 7 millones de personas sufren la enfermedad de Chagas, presentando cada año una incidencia de 40.000 nuevos casos y 20.000 muertes relacionadas con esta afección.

En cuanto a la distribución geográfica, originariamente los casos de infecciones con *T. cruzi* se restringían a zonas rurales endémicas de la región de América Latina, sin embargo, debido al aumento en la movilidad en la población, actualmente se han detectado casos en países no endémicos como Estados Unidos, Canadá y otros países europeos y africanos (Schmunis y Yadon, 2010; Rassi *et al.*, 2012).

En zonas endémicas la enfermedad se transmite principalmente por vía vectorial, por contacto con las heces u orina infectadas de insectos triatominos hematófagos. Este parásito puede colonizar y multiplicarse en al menos siete géneros de triatominos y transmitirse a una amplia variedad de vertebrados, entre ellos los humanos. En Argentina el *Triatoma infestans* es el insecto vector mayoritario, conocido popularmente como vinchuca. Estos insectos generalmente pican en zonas expuestas de la piel y defecan cerca de la picadura. *T. cruzi* ingresa al organismo cuando el individuo se frota instintivamente la zona generando el contacto entre



las heces y la lesión cutánea, boca u ojos (Dias et al., 2002; Tyler y Engman, 2001; Cámara et al., 2019).

Otras vías de transmisión pueden ser el consumo de alimentos contaminados, transfusión de sangre o trasplante de órganos provenientes de personas infectadas, transmisión vertical de madre a hijo durante el embarazo o incluso por accidentes en los laboratorios de diagnóstico e investigación (Organización Mundial de la Salud, 2021).

Ante la ausencia de vacunas disponibles, junto con el hecho de que los medicamentos aprobados para el tratamiento de la infección presentan toxicidad y eficacia variable, la principal estrategia de control de la enfermedad de Chagas aún se basa en la prevención de la transmisión del parásito controlando al vector domiciliario mediante el uso de insecticidas y el testeo serológico en bancos de sangre y donantes de órganos (Dias *et al.*, 2002; Buscaglia *et al.*, 2006; Balouz *et al.*, 2021).

1.2. Ciclo de vida de *T. cruzi*:

T. cruzi es un parásito unicelular que posee un ciclo de vida digénico que alterna entre insectos triatominos y un mamífero hospedador, incluido el hombre (Brener, 1973). Durante su ciclo de vida el parásito atraviesa distintos estadios que implican cambios morfológicos y de expresión génica. El ciclo infectivo comienza cuando el insecto hematófago se alimenta de la sangre de un mamífero infectado (Figura 1). Parásitos circulantes, en su estadio de tripomastigote sanguíneo, ingresan al tracto digestivo anterior del insecto y allí se diferencian extracelularmente a epimastigotes. En esta forma mayoritaria se replican a lo largo del tracto digestivo del triatomino y al alcanzar la última porción de su recorrido, la ampolla rectal, se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. Estos últimos poseen la capacidad de infectar al hospedador vertebrado y son excretados al momento en el que el insecto se alimenta. Una vez en contacto con la herida sobre la piel del mamífero, infectan células cercanas al sitio de ingreso y, dentro del citoplasma celular, se diferencian al estadio amastigote. En esta fase llevan a cabo varias rondas de división por fisión binaria antes de diferenciarse a tripomastigotes sanguíneos que, luego de lisar la célula huésped, se liberan al medio extracelular, circulación sanguínea y linfática siendo capaces de migrar a otros tejidos, invadir nuevas células nucleadas o ser ingeridos por un nuevo insecto reanudando nuevamente el ciclo (Figura 1) (Bern, 2015; Tyler y Engman, 2001; Dias et al., 2002).





Figura 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*, adaptado de Bern, 2015.

1.3. Glicoproteínas de membrana en T. cruzi

La cubierta celular de *T. cruzi* está compuesta por una densa capa de glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos), fundamentales para su transmisión y su supervivencia en el hospedador insecto y mamífero. Estas moléculas muestran un alto grado de ordenamiento y un perfil de expresión estadío-específico (De Souza *et al.*, 2010). La mayoría de ellas se encuentran ancladas a la capa externa de la membrana lipídica del parásito mediante un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI). Entre las glicoproteínas de cubierta más prevalentes se incluyen las trans-sialidasas (TS) (Yoshida, 2006; Giorgi y de Lederkremer, 2020; Campetella *et al.*, 2020), moléculas tipo TS, MASPs (*Mucin-Associated Surface Proteins*) (De Pablos *et al.*, 2011; Campetella *et al.*, 2020) y mucinas (Buscaglia *et al.*, 2006; Giorgi y de Lederkremer, 2020).



protección frente a los mecanismos de defensa propios tanto del insecto vector como del mamífero. Asimismo, son cruciales en el reconocimiento y adhesión a distintos endotelios del tracto digestivo del vector y a células blanco de infección en el hospedador (Buscaglia *et al.*, 2006; Cámara *et al.*, 2019).

Las mucinas de *T. cruzi* son glicoproteínas cuya cadena polipeptídica se caracteriza por ser rica en residuos de Serina y Treonina conformando múltiples sitios aceptores de oligosacáridos, los que son agregados postraduccionalmente mediante enlaces *O*-glicosídicos. En base a criterios estructurales, se han identificado distintos grupos de mucinas en este patógeno (Buscaglia *et al.*, 2006). Estos grupos presentan expresión diferencial según el estadio del ciclo del parásito, y a su vez cumplen distintas funciones tendientes a establecer una óptima interacción con el insecto vector y el hospedador (Buscaglia *et al.*, 2006).

TSSA (Trypomastigote Small Surface Antigen) es una proteína de T. cruzi de múltiples aplicaciones diagnósticas codificada por un gen de tipo mucina (Di Noia *et al.*, 2002; Balouz *et al.*, 2015; Balouz *et al.*, 2017; Balouz *et al.*, 2021). TSSA también está flanqueada por un péptido señal (SP) y una señal de anclaje por GPI, aunque se distingue del resto de las mucinas de T. cruzi por poseer apenas 92 aminoácidos, de los cuales apenas 40 constituyen el *core*, que es la única región presente en la proteína madura, luego del procesamiento de sus señales de ingreso a retículo endoplásmico y anclaje a membrana (Figura 2. A.). TSSA también se distingue del resto de las mucinas de T. cruzi por sufrir un menor número de O-glicosilaciones *in vivo* (Cámara *et al.*, 2017) y, sobre todo, por presentar polimorfismos entre cepas del parásito (ver debajo). Estudios de Western Blot e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) demostraron que la expresión de TSSA se encuentra restringida al estadio de tripomastigotes derivados de células, el equivalente de cultivo de los tripomastigotes sanguíneos (Di Noia *et al.*, 2002).

T. cruzi presenta una población muy estructurada, conformada por múltiples cepas o aislamientos de gran diversidad genética, fenotípica y eco-epidemiológica (Zingales, 2018). Mediante la identificación de ciertos marcadores bioquímicos y genéticos fue posible agrupar estas cepas en seis linajes evolutivos o Unidades de Tipificación Discretas (DTUs) principales, denominados TcI a TcVI, además de un potencial séptimo linaje nombrado Tcbat emparentado a TcI (Lima *et al.*, 2015). A pesar de que las relaciones evolutivas entre estas DTUs no se han aclarado por completo, distintos estudios sugieren que TcI, TcII, TcIII y TcIV



tienen orígenes más antiguos mientras que TcV y TcVI son cepas híbridas producto de cruzas recientes y probablemente independientes entre TcII y TcIII (Zingales, 2018).

Distintas cepas del parásito muestran una serie de polimorfismos en los alelos de TSSA, mayormente presentes en la parte central o *core*, que permiten su clasificación en cuatro isoformas cada una de las cuales corresponde a una DTU en particular: TSSAI (TcI), TSSAII (TcII), TSSAIII (TcIII) y TSSAIV (TcIV) (Figura 2. B.). Por otra parte, se observó que en los genomas de las cepas híbridas TcV y TcVI (producto del cruzamiento de las cepas parentales TcII y TcIII) se encuentran codificadas ambas isoformas TSSAII y TSSAIII en dos *loci* genómicos independientes (Figura 2.B.) (Di Noia *et al.*, 2002; Bhattacharyya *et al.*, 2010; Balouz *et al.*, 2021). Análisis realizados sobre los genomas de *T. cruzi* develaron que TSSA se encuentra codificada por 12-14 copias del gen dispuestas en tándem cabeza-cola en todas las cepas, incorporando un *locus* no sinténico adicional de una sola copia en las cepas híbridas. Los genes dispuestos en tándem en las cepas TcV y TcVI codifican únicamente para TSSAII mientras que el gen extra de copia única codifica para TSSAIII (Balouz *et al.*, 2021).



Figura 2: Estructura y secuencia aminoacídica de la proteína TSSA. (A) Representación esquemática de la proteína, donde se destacan un péptido señal (SP, aminoácidos 1-26), una región central o core (aminoácidos 27 a 66) y una señal de anclaje por glicosilfosfatidilinositol (GPI, aminoácidos 67-92). (B) Secuencia aminoacídica deducida de las diferentes isoformas de referencia pertenecientes a los linajes TcI a TcIV, con su respectivo número de acceso en GenBank. En color se indican las posiciones y aminoácidos que varían entre las mismas. Se indican los sitios predichos de clivaje del SP y el aminoácido aceptor del ancla GPI con triángulos vacíos y rellenos respectivamente. Adaptado de Bhattacharyya *et al.*, 2010.

1.4. Caracterización funcional de TSSA

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que TSSA, y particularmente la isoforma TSSAII, cumple un rol en la interacción (adhesión/señalización) del tripomastigote



con distintos tipos de células no macrofágicas del mamífero, lo cual es un prerrequisito para su invasión efectiva. Esta hipótesis quedó en evidencia al observar la interacción de moléculas recombinantes de TSSAII con células de mamíferos, una reducción drástica de los niveles de infección en monocapas de células en presencia de anticuerpos específicos y/o moléculas recombinantes de TSSAII añadidas exógenamente y la aparición de un fenotipo adhesivo en epimastigotes (estadio no infectivo) al inducir la expresión ectópica de esta proteína. Además, se observó que la presencia de péptidos derivados de TSSAII provocaron en células blanco el desencadenamiento de cascadas de señalización compatibles con aquellas que ocurren durante el proceso de internalización de tripomastigotes (Gironès *et al.*, 2001; Cánepa *et al.*, 2012). En línea con estos resultados, parásitos de la cepa CL Brener sobre-expresantes para la proteína TSSAII mostraron un aumento significativo en su capacidad adhesiva e infectiva en comparación con el control salvaje o *wild type (wt)* (Cámara *et al.*, 2017; Cánepa *et al.*, 2012).

En contraste, la proteína TSSAI presentó bajos niveles de adhesión en monocapas de células y la adición exógena de TSSAI recombinante no afectó la infectividad *in vitro* de tripomastigotes del linaje TcVI ni, llamativamente, del linaje TcI. Más aún, parásitos de la cepa CL Brener sobre-expresantes para la proteína TSSAI no mostraron un aumento significativo en su capacidad adhesiva e infectiva de las células blanco en comparación con el control *wt*. Todos estos datos en conjunto sugieren que las variaciones entre isoformas de TSSA no poseen los mismos roles en términos de adhesión y transducción de señales (Burleigh y Woolsey, 2002; Cánepa *et al.*, 2012).



2. Antecedentes:

2.1. Obtención de parásitos editados para el locus TSSA.

Escasos son los precedentes de obtención de líneas parasitarias knock out (KO) o knock down (KD) en T. cruzi. Además de las dificultades técnicas inherentes al sistema, este tipo de aproximaciones genéticas suelen ser particularmente difíciles de implementar en T. cruzi cuando se intenta hacer blanco en sus familias multigénicas, con cientos de copias presentando distinto nivel de polimorfismo y ubicadas en distintas regiones del genoma (Teixeira et al., 2011). En trabajos previos de nuestro laboratorio se había ensayado la deleción de los genes de TSSA por la técnica de reemplazo alélico o recombinación homóloga. El método no fue exitoso ya que un análisis genotípico demostró la presencia de al menos 3 copias remanentes del gen TSSAII, evidenciando que el reemplazo alélico había ocurrido de forma parcial. Asimismo, ensayos de Western Blot realizados sobre tripomastigotes de las líneas generadas confirmaron la expresión de TSSA (y a niveles indistinguibles del wt) en todos los clones ensayados (Balouz, 2020). Debido a estos resultados, en el marco de la Tesis Doctoral de Virginia Balouz (Balouz, 2020), y con el fin de continuar los estudios sobre el rol funcional de TSSA, se decidió retomar el proyecto, esta vez aplicando la técnica CRISPR-Cas9 que recientemente había sido implementada en T. cruzi (Peng et al., 2014; Lander et al., 2015). El método de edición por CRISPR-Cas9 se basa en el direccionamiento de la nucleasa Cas9 mediado por secuencias de ARN específicamente diseñadas (sgARNs) hacia un gen blanco de interés. Al reconocer la secuencia target (protospacers) la nucleasa genera cortes cuya resolución deriva en el reemplazo de dicho fragmento por una copia mutada, en este caso conteniendo un cassette de resistencia antibiótica (y co-transfectada junto a la nucleasa Cas9 y los sgARNs), mediante un proceso de recombinación homóloga (Yagoubat et al., 2020).

Esta técnica se llevó a cabo en parásitos de la cepa híbrida RA (linaje TcVI) ya que se trata de una cepa de *T. cruzi* autóctona (Gonzalez Cappa *et al.*, 1981) y altamente virulenta, comúnmente utilizada en modelos de infección *in vivo* en laboratorios de investigación en enfermedad de Chagas del país (Tekiel *et al.*, 2005; Cevey *et al.*, 2016). Brevemente, las secuencias *target* (*protospacers*) de TSSA fueron seleccionadas y priorizadas por medio de un predictor informático (Peng y Tarleton, 2015) y las 4 secuencias mejor ranqueadas fueron amplificadas junto con el ARN scaffold para obtener los sgARNs. Estos se



clonaron en el vector Cas9plasmid-pTREX-n el cuál codifica para la nucleasa Cas9 en fase con la proteína *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) y conteniendo una secuencia de direccionamiento al núcleo. Este plásmido confiere resistencia a neomicina (G418). Por otro lado, se clonó un cassette de resistencia a blasticidina, cuya expresión está controlada por secuencias regulatorias de los genes TcP2 β (HX1) y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) del propio parásito (Figura 3). Por fuera de estas secuencias regulatorias, se clonaron regiones de homología (RH) correspondientes a las secuencias 5' y 3' no codificantes del gen TSSA, para mediar el reemplazo alélico (Figura 3) (Balouz, 2020).



dentro del tándem TSSAII

Figura 3: Esquema de los *loci* de TSSA en el genoma de *T. cruzi* y de la estrategia usada para su edición. (A y D) Representación de los *contigs* donde se encuentran las secuencias de TSSAII (en rosado en TCC55) y TSSAIII (en violeta en TCC216) obtenidos a partir de la cepa TCC (TcVI), secuenciada a alta resolución usando tecnologías de última generación (Berná *et al.*, 2018). (B) Esquema ampliado de la secuencia TSSAII junto con los RH (regiones de homología) utilizadas también para la delación del *locus* de TSSAIII. (C y E) Productos esperados luego de la deleción por Cas9 y la recombinación homóloga con el cassette de expresión de blasticidina con secuencias regulatorias HX1 y GAPDH. Adaptado de Balouz, 2020.

Una vez transfectados con dichos constructos los parásitos en estadio epimastigote se seleccionaron utilizando los antibióticos Blasticidina y G418. Se confirmó la expresión y localización nuclear de la endonucleasa mediante la visualización de la proteína fluorescente EGFP por microscopía de epifluorescencia usando como control la cepa RA *wt*



(Balouz, 2020). Con el fin de obtener poblaciones genéticamente homogéneas se realizó el método de clonado por dilución límite (Balouz *et al.*, 2019). A las líneas resultantes se les realizó una exhaustiva caracterización mediante técnicas de *polymerase chain reaction* (PCR) con oligonucleótidos diseñados en regiones codificantes y/o flanqueantes a los distintos genes TSSA para interrogar los posibles rearreglos ocurridos. Como consecuencia, se identificaron tres clones con variantes genotípicas interesantes: el clon 3, con deleción parcial del *locus* TSSAII y el *locus* TSSAIII intacto, el 10 con deleción total del *locus* TSSAIII y del tándem completo de genes TSSA, se identificaron rearreglos relacionados posiblemente con el proceso de reparación post-edición génica (Figura 4) (Balouz, 2020).



Figura 4: Diagrama representativo de las características genéticas de tres clones resultantes de la edición de TSSA en la cepa RA de *T. cruzi*. El Clon 3, con deleción parcial del *locus* TSSAII y *locus* TSSAIII intacto; y los Clones 9 y 10, con deleción total de ambos *loci*. Adaptado de Balouz, 2020.

2.2. Análisis fenotípico de las líneas editadas

Teniendo en cuenta que TSSA es una proteína cuya expresión se encuentra restringida al estadio de tripomastigote, se obtuvo esta forma ciclando las líneas *in vitro* (Balouz *et al.*, 2019). Se realizaron sobre éstas ensayos de Western Blot (Figura 5) e



inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anticuerpos anti-TSSAII generados en el laboratorio. Solo el clon 3, el cual mostró una deleción parcial del *locus* TSSAII (Figura 4), presentó señal para TSSA, y en niveles similares a la cepa *wt* (Figura 5).



Figura 5: Expresión de TSSA en tripomastigotes de los clones editados. Fracciones totales de tripomastigotes de las líneas indicadas se ensayaron por Western Blot utilizando anticuerpos anti-TSSAII (panel inferior, en verde) y anti-GDh de *T. cruzi* (panel superior, en rojo), como control de carga. Fracciones de tripomastigotes de la cepa RA *wt* se usaron como control positivo. Los marcadores de peso molecular (en kDa) se indican a la izquierda. Adaptado de Balouz, 2020.

Posteriormente se realizaron ensayos de infección en monocapas de células Vero (Figura 6. A.) con el fin de evaluar el efecto de la edición del *locus* de TSSA sobre los procesos de adhesión e internalización del tripomastigote. Se observó que los clones 9 y 10 mostraron una infectividad menor, aproximadamente del 50% con respecto al control *wt* y el clon 3 (Figura 6. B.). Este último mostró niveles de infectividad comparables a los de la cepa *wt*.





fenotipo de parásitos editados en TSSA. (A) Se infectaron monocapas de Vero células con tripomastigotes de los clones editados o de la cepa RA wt. Se realizaron IFIs (marcación: anti-T.cruzi en verde y DAPI en azul). Se 2 muestran imágenes representativas para cada ensayo. (B) Cuantificación de la infección para cada clon. Se relativizó la infección al valor obtenido con la cepa RA wt y se graficó y analizó estadísticamente. Todos los ensayos se realizaron triplicado por (n=3). Adaptado de Balouz, 2020.

Figura 6: Estudio del



Página 20 de 71



Los ensayos de infectividad también se realizaron utilizando un modelo tridimensional de esferoides de células HeLa. Estas estructuras permiten evaluar no solo la capacidad de invasión celular sino también la interacción y migración del parásito a través de la matriz extracelular y conjunto de células. Al finalizar estos ensayos se observó que los clones 9 y 10 poseían una menor capacidad de transmigración hacia el centro de la estructura (Figura 7) (Balouz, 2020).



Figura 7: Ensayo de migración e infección de parásitos editados en TSSA en esferoides tridimensionales de células HeLa. Imágenes representativas tomadas con microscopio confocal a distintos niveles de profundidad en esferoides infectados con las distintas líneas de parásitos. En verde se observan los tripomastigotes teñidos con *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester* (CFSE) y en rojo las células HeLa. Se distingue un menor número de tripomastigotes en aquellos esferoides infectados con los clones 9 y 10 en comparación con aquellos infectados con los clones 3 y el control *wt*. Adaptado de Balouz, 2020.



Con el fin de indagar si la disminución en los niveles de infección observados en ambos ensayos (monocapa celular y esferoides) eran causados por un déficit en la motilidad de los parásitos KO (clones 9 y 10) a causa de la ausencia de la proteína TSSA se realizaron ensayos de migración en medio líquido y matrices semisólidas de colágeno tipo I, utilizando como controles parásitos RA *wt*. Para el análisis se grabaron videos y se realizó el seguimiento manual de los parásitos cuadro por cuadro para evaluar su motilidad. Al analizar las grabaciones, se clasificaron los parásitos según su velocidad y su tipo de movimiento: tumbler, persistente o intermitente. Como resultado del ensayo no se observaron diferencias significativas en cuanto a la velocidad de desplazamiento y el tipo de movimientos identificados entre los clones y el control (Balouz, 2020).

En conjunto, estos antecedentes permiten inferir que la disminución de los niveles de transmigración en los parásitos TSSA OK no se relaciona con una alteración en la motilidad, sino que podría atribuirse a diferencias relacionadas con la interacción de los parásitos con componentes de la matriz extracelular o de la superficie de las células. Esta hipótesis, además, es consistente con los resultados obtenidos previamente, mediante ensayos bioquímicos (Cánepa *et al.*, 2012) y de expresión homóloga (Cámara *et al.*, 2017). Más aún, ensayos *in vivo* con parásitos editados revelaron un correlato funcional entre el dosaje genómico de TSSA y la capacidad infectiva de las líneas: mientras que los clones 9 y 10 (con deleción total del *locus* TSSAII) vieron disminuida su infectividad, el clon 3 (con deleción parcial para el *locus* TSSAII) mostró niveles de infectividad comparables a la cepa parental (RA) (Balouz, 2020).

Sin embargo, al haberse utilizado la técnica CRISPR para la edición génica y obtención de estas líneas modificadas, y teniendo en cuenta su posterior y reiterada manipulación, no puede descartarse que el fenotipo observado en las líneas KO para TSSA se deba (al menos parcialmente) a posibles daños colaterales (*off target*) sobre otras regiones del genoma (Zhang *et al.*, 2015).



3. Objetivos:

Teniendo en cuenta todo lo expresado en las secciones anteriores, el objetivo general de este proyecto es generar herramientas moleculares y celulares que posibiliten realizar experimentos de complementación funcional en los parásitos editados en TSSA. Estas permitirán restablecer la expresión de TSSA en las distintas líneas editadas y, en un futuro, evaluar los fenotipos resultantes. Estos experimentos, además, emergen como una alternativa interesante para profundizar los estudios acerca de la relevancia funcional de la variabilidad intrínseca de TSSA. En este sentido, evaluaremos la complementación funcional de las líneas mutantes con distintas isoformas de TSSA (TSSAI, TSSAII y TSSAIII).

Este objetivo general puede desglosarse en los siguientes objetivos específicos:

- Diseño de genes sintéticos para la expresión ectópica de distintas variantes poblacionales de TSSA en líneas de *T. cruzi* editadas para estos genes.
- (2) Clonado de genes sintéticos desarrollados en (1) en vectores de expresión en T. cruzi.
- (3) Transfección de distintas líneas de parásitos (cepas con edición total o parcial de genes TSSA y cepa parental) con construcciones obtenidas en (2).
- (4) Establecimiento y selección de las líneas transfectadas en cultivo axénico.
- (5) Análisis de expresión de las distintas TSSA en las líneas transfectadas.



4. Hipótesis:

La hipótesis general formulada por nuestro equipo, y sostenida por numerosos resultados previos, plantea que TSSA es una molécula relevante durante la infección por *T. cruzi* y, por lo tanto, constituye un atractivo blanco potencial para el desarrollo de nuevas estrategias de intervención en la Enfermedad de Chagas. Las recientes evaluaciones fenotípicas de parásitos editados son totalmente consistentes con esta idea, y señalan a TSSA como un factor clave para la interacción entre el tripomastigote sanguíneo y la célula donde va a establecer su nicho replicativo. Sin embargo, la validación de estos resultados mediante ensayos de complementación funcional permitiría afianzar esta correlación.

Con este fin, en este trabajo de Tesis nos proponemos desarrollar las herramientas necesarias para implementar estos ensayos. Brevemente, se generarán genes sintéticos para distintas isoformas de TSSA, los cuales serán clonados en vectores apropiados para su expresión en *T. cruzi*. Estas construcciones, diseñadas de acuerdo a las restricciones impuestas por el sistema de modificación genética utilizado, y controles apropiados, serán transfectadas en las líneas de parásitos editados y en la línea parental a partir de la cual estos fueron derivados. La hipótesis que nos planteamos consiste en que las modificaciones incorporadas en el diseño de estos constructos, incluyendo mutaciones en las secuencias codificantes de las TSSA que las vuelvan resistentes a la acción de la maquinaria CRISPR-Cas9 y la presencia de etiquetas antigénicas en posiciones adecuadas, permitirán la expresión y el seguimiento de estas proteínas en las líneas de parásitos transfectadas.



5. Materiales y métodos:

5.1. Técnicas de biología molecular:

5.1.1. Preparación de E. coli DH5aF competentes

La obtención de bacterias *E. coli* DH5 α F competentes se llevó a cabo utilizando el método Inoue (Inoue *et al.*, 1990). Brevemente, se inocularon 25 ml de medio SOB (*Super Optimal Broth*, Anexo 2) con una colonia bacteriana previamente crecida en una placa de Petri durante 16-20 h a 37 °C. Dicho cultivo se incubó con agitación moderada durante 8 h a 37 °C. Luego, con 4 ml del cultivo anterior se inoculó un Erlenmeyer con 250 ml de medio SOB y se incubó con agitación moderada a 18 °C durante toda la noche (over night, ON). Se monitoreó la densidad óptica (DO) a 600 nm y al alcanzarse una absorbancia de 0,55 se transfirió el cultivo a un baño con hielo, donde se incubó por 10 min. Pasado este tiempo, se cosecharon las bacterias por centrifugación a 2500 x g durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron suavemente en 80 ml de solución Inoue (Anexo 2) previamente enfriada. Se centrifugó nuevamente a 2500 x g durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron las bacterias suavemente en 20 ml de solución Inoue (Anexo 2) helada. Luego, se agregaron 1,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), se dividió la suspensión en alícuotas de 0,2 ml en tubos estériles y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido. Las alícuotas fueron criopreservadas, almacenadas a -70 °C hasta su utilización.

5.1.2. Transformación de bacterias *E. coli* DH5αF

Las bacterias preparadas en el punto anterior fueron transformadas utilizando el método de "*Shock* térmico". Alícuotas de 200 µl de bacterias competentes fueron incubadas en hielo con 2-10 ng del ADN plasmídico de interés durante 15 min. Todos los plásmidos utilizados portaban un cassete de resistencia a ampicilina. Luego fueron sometidas a un golpe térmico a 42 °C durante 90 seg. Rápidamente fueron recuperadas agregando 1 ml de medio LB (*Lysogeny Broth*, Anexo 2) e incubándolas a 37 °C por 1 h. Finalmente, se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min y se descartaron aproximadamente 900 µl del sobrenadante. El pellet de bacterias fue resuspendido suavemente en los 100 µl restantes, los cuales se sembraron en placas de Petri con medio LB-agar (1,5%, Anexo 2) suplementado con ampicilina (100 µg/ml).



5.1.3. Condiciones de cultivo bacteriano

Los cultivos de *E. coli* se crecieron a 37°C en agitador rotatorio (200-250 rpm) o en placas de Petri con 1.5% de agar en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, en este caso se utilizó ampicilina 100 µg/ml.

5.1.4. Minipreparación estándar de plásmidos

El ADN plasmídico fue purificado mediante un protocolo adaptado del método de lisis alcalina el cual permite aislar un aproximado de 3-4 µg de plásmido a partir de 5 ml de cultivo. Se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min las bacterias presentes en 3 ml de cultivo de E. coli en fase estacionaria. Se resuspendió vigorosamente el pellet bacteriano en 100 µl de solución de resuspensión P₁ (Anexo 2). Se adicionaron 200 µl de solución P₂ (Anexo 2) y se mezcló cuidadosamente por inversión, provocando la lisis celular y la liberación y desnaturalización del ADN genómico y plasmídico. Para renaturalizar el ADN plasmídico se agregaron 200 µl de solución P₃ (Anexo 2) mezclando suavemente por inversión. Luego se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 10 min generando la precipitación del ADN genómico. Se recuperó el sobrenadante, fracción que contiene el ADN plasmídico, y se sometió a una extracción orgánica adicionando 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), emulsionando las fases mediante fuerte agitación con vortex y centrifugando nuevamente a 14000 rpm durante 1 min. Se recuperó la fase acuosa y se repitió este paso para garantizar la eliminación de impurezas presentes. Finalmente, se precipitó el ADN plasmídico al agregar 700 µl de isopropanol y centrifugar a 14000 rpm por 15 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet obtenido agregando 500 µl de etanol 70% (v/v) para eliminar sales presentes. Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se secó en un termobloque a 37 °C y se resuspendió en agua Milli-Q.

5.1.5. Midipreparación de plásmidos

Para escalar la obtención de ADN plasmídico de alta pureza se utilizó el Kit GenElute HP Plasmid Midiprep (Sigma, EE. UU.) (con una eficiencia de aislamiento de hasta 350 µg de ADN plasmídico según especificaciones del proveedor). Este método permite preparar ADN en cantidad y pureza suficiente para la transfección de epimastigotes de *T. cruzi* (ver debajo). Si bien las etapas iniciales son adaptaciones del método tradicional de lisis



alcalina, los pasos de concentración del ADN plasmídico se basan en el aislamiento y purificación por columna de afinidad a sílica. Se siguieron las especificaciones del fabricante y se utilizaron todas las soluciones y materiales proporcionados por el kit, los cuales se nombran a continuación entre comillas.

Brevemente, se inocularon 5 ml de medio LB suplementado con el correspondiente antibiótico con una colonia bacteriana previamente crecida en placa de Petri. Se incubó el cultivo a 37 °C por 8 h con agitación moderada y luego se escaló a un volumen final de 100 ml en un erlenmeyer diluyendo el cultivo inicial 1:500 e incubándolo ON a 37 °C con agitación moderada. Se cosechó el volumen total mediante centrifugación a 3500 rpm durante 10 min. Se resuspendió el pellet bacteriano en 4 ml de "Resuspension Solution". A continuación, se adicionaron 4 ml de "Lysis Solution", se mezcló cuidadosamente por inversión y se incubó 5 min a RT. Se neutralizó el lisado con 4 ml de "Neutralization Solution" y se agregaron 3 ml de "Binding Solution". Seguidamente, se volcó el lisado dentro de una jeringa con filtro proporcionada por el kit, se dejó incubar allí por 5 min y luego se centrifugó eliminando el dervis celular del eluato de interés. Por otra parte, se colocó una "Binding Column" dentro de un tubo colector y se agregaron luego 4 ml de "Column Preparation Solution". Se centrifugó el armado en un rotor swinging bucket por 2 min a 3000 rpm de modo tal que la solución pase a través de la columna. Se descartó el eluato y se agregó esta vez el lisado filtrado por la jeringa. Se centrifugó nuevamente descartando el eluato. Se agregaron 4 ml de "Wash Solution 1", se repitió la centrifugación y el descarte del eluato. Este paso se realizó nuevamente, pero utilizando esta vez la "Wash Solution 2". La columna fue pasada a un nuevo tubo colector, se le agregó 1 ml de "Elution Solution" y se centrifugó a la misma velocidad, esta vez durante 5 min. El eluido se repartió en dos tubos eppendorf, en cada uno se realizó el siguiente procedimiento: se agregaron 0,1 volúmenes de NaAc (3M) y 0,7 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 30 min a 4 °C. Luego, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 70% v/v. Finalmente se volvió a centrifugar en las mismas condiciones por 10 min. El pellet resultante se secó en un termobloque a 37 °C y se resuspendió en agua Milli-Q.



5.1.6. Cuantificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico fue cuantificado mediante el análisis de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher, EE. UU.).

5.1.7. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Los geles para electroforesis de ADN utilizados se prepararon en solución TBE 0,5X (Tris, Acetato y EDTA) con 1-1,5% (w/v) de agarosa y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. Antes de la siembra, a las muestras se les agregó un volumen apropiado de solución de siembra LB-10X (*Loading Buffer*, Anexo 2). Los geles fueron visualizados en un transiluminador UVP (Fotodyne, EE. UU.) y fotografiados.

5.1.8. Diseño y obtención de genes sintéticos

Las variantes de TSSA modificadas fueron diseñadas *in silico* en el laboratorio (ver sección de Resultados) y sintetizadas por encargo en Macrogen Inc (Seul, Korea). Los genes, flanqueados por los sitios de restricción para las enzimas XhoI y NotI fueron recibidos clonados dentro del plásmido comercial pTOP Blunt V2 (que confiere resistencia a Ampicilina) en su forma liofilizada (Figura 8). Todos ellos fueron rehidratados con agua Milli-Q y amplificados en *E. coli* de acuerdo con lo descrito arriba antes de ser utilizados.



Figura 8: Representación gráfica de los plásmidos conteniendo los genes TSSA sintéticos. (A) Conjunto de plásmidos comerciales pTOP Blunt V2 donde se recibieron clonados los genes sintéticos encargados (codificando para TSSAI, TSSAII y TSSAIII). Se indica el tamaño total del plásmido en pares de bases (pb), los sitios de restricción utilizados (XhoI y NotI) y el tamaño del gen TSSA en cada caso.

5.1.9. Vector de expresión en *T. cruzi*

Las variantes de TSSA modificadas fueron subclonadas en el vector pTEXL, de expresión constitutiva (controlada por secuencias regulatorias del gen GAPDH de *T. cruzi*)



(Bouvier *et al.*, 2013). Este plásmido posee resistencia a Ampicilina, para su amplificación en bacterias, e higromicina para la selección de los parásitos.

5.1.10. Obtención de oligonucleótidos correspondientes al nuevo MCS y construcción del vector pTEXL

El vector pTEXL se modificó usando técnicas de biología molecular, previo a su utilización en este trabajo. Brevemente, se escindió el sitio de clonado múltiple (MCS) y el gen codificante para la proteína reportera EGFP y se lo reemplazó por un nuevo y más variado MCS. El nuevo MCS fue generado en el laboratorio a partir de 2 oligonucleótidos parcialmente complementarios (MCS-Fw y MCS-Rv), sintetizados por encargo en Macrogen Inc (Seul, Korea):

- MCS-Fw: 5'-GATCCTCGAGTCGACATCGATGC-3'
- MCS-Rv: 5'-GGCCGCATCGATGTCGACTCGAG-3'

Para el apareamiento de los oligonucleótidos, primero se resuspendió el contenido de cada tubo en agua Milli-Q, a modo de obtener una concentración de 100 μ M final. Se realizaron dos preparaciones, una con cada tubo, conteniendo 1 μ l de la solución anterior, 1 μ l de buffer ligasa 1X y 8,5 μ l de agua Milli-Q. Ambas preparaciones se mezclaron y se agregaron 2,2 μ l de *Annealing Buffer* 10X (Anexo 2).

Se incubó la preparación en un termociclador a una temperatura inicial de 94 °C por 5 min descendiendo luego la temperatura 2 °C por minuto hasta llegar a los 4 °C. Una vez finalizado este proceso se mantuvo la muestra en hielo para proceder inmediatamente a la ligación.

5.1.11. Digestión enzimática de ADN

Para la obtención y el posterior chequeo de los constructos utilizados en este trabajo se realizaron distintas digestiones enzimáticas con las siguientes enzimas de restricción: SacI, SpeI, PstI, BamHI, XhoI y NotI (todas de NEB, EE. UU.). En todos los casos se trabajó con las proporciones de 1 U de enzima por cada 1 μ g de ADN, incubando la solución durante 3 h a 37 °C. Para obtener los fragmentos de interés se procedió a separar los productos de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%, extraer la sección del gel



correspondiente y purificar el ADN mediante el kit de extracción de Dongsheng Biotech (China) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.1.12. Ligación de fragmentos de ADN

Para la ligación del vector de expresión pTEXL con el nuevo MCS se diluyó el producto obtenido en el punto 5.1.9. 1/25 en *Annealing Buffer* 1X. Se tomaron 2,2 μ l de dicha solución y se le agregaron 6 μ l (25 ng) de plásmido pTEXL digerido previamente con las enzimas de restricción BamHI y NotI, 2 μ l de *Reaction Buffer* 10X (Promega), 0,5 U de T4 ADN ligasa (Promega, EE. UU.) y 9,3 μ l de agua Milli-Q. Se incubó la muestra durante 4 hs a RT.

Las ligaciones del vector de expresión pTEXL (con el nuevo MCS ya incluido) con los genes sintéticos codificantes para TSSA se realizaron en medio *Reaction Buffer* 10X (Promega, EE. UU.) (Anexo 2) utilizando una relación molar inserto:vector de 3:1 con 50 ng de vector en un volumen final de 20 μ l y 1 U de T4 ADN ligasa (Promega, EE. UU.). Se incubaron las muestras durante 4 h a RT.

5.1.13. Secuenciación de ADN:

Los plásmidos a analizar fueron debidamente amplificados en cultivos de *E. coli*, purificados (en todos los casos, siguiendo los protocolos descritos anteriormente), cuantificados, llevados a una concentración de 200 ng/µl y enviados a Macrogen Inc (Seul, Korea) donde fueron secuenciados por el método Sanger utilizando los oligonucleótidos pTEXL-Fw y pTEXL-Rv:

- pTEXL-Fw: 5'-ACAAGAGCACAAACAAATTC-3'
- pTEXL-Rv: 5'-AAAAAGGGAAGTGAGCAAAA-3'

5.2. Cultivos de T. cruzi

5.2.1. Mantenimiento de líneas de epimastigotes establecidas

Las líneas parasitarias establecidas se crecieron en suspensión en botellas para cultivo celular a 28 °C en 5 ml de medio *Brain Heart Tryptose* (BHT, Anexo 2) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco Thermo Fisher, EE. UU.) inactivado por calor. Los cultivos se repicaron una vez por semana conservando únicamente 0,5 ml de cultivo en



cada botella y agregando 5 ml de medio fresco. Semanalmente se observaron los cultivos bajo microscopio óptico para controlar el correcto crecimiento y la ausencia de contaminantes.

Los medios utilizados fueron suplementados con antibióticos según la línea celular de la que se tratase (Tabla I). Se utilizó higromicina para la selección de transfectantes cuya resistencia fue conferida por el plásmido pTEXL utilizado. Por otro lado, los medios de clones 3, 9 y 10 fueron además suplementados con Blasticidina y G418, resistencia conferida por el procedimiento de edición génica al que se los sometió en trabajos anteriores.

El número de parásitos presentes en los cultivos o en alícuotas de estos fue calculado a partir del recuento en Cámara de Neubauer mediante microscopio óptico.

LÍNEA CELULAR	Higromicina (100 µg/ml)	Blasticidina (10 μg/ml)	G418 (100 μg/ml)
Clon 3 pTEXL-TSSAI	Х	Х	Х
Clon 3 pTEXL-TSSAII	Х	Х	Х
Clon 3 pTEXL-TSSAIII	Х	Х	Х
Clon 9 pTEXL-TSSAI	Х	Х	Х
Clon 9 pTEXL-TSSAII	Х	Х	Х
Clon 9 pTEXL-TSSAIII	Х	Х	Х
Clon 10 pTEXL-TSSAI	Х	Х	Х
Clon 10 pTEXL-TSSAII	Х	Х	Х
Clon 10 pTEXL-TSSAIII	Х	Х	Х
RA pTEXL-TSSAI	Х		
RA pTEXL-TSSAII	Х		
RA pTEXL-TSSAIII	Х		

Tabla I: Se describen los antibióticos utilizados para la selección de cada cultivo transfectado.

5.2.2. Transfección de epimastigotes por electroporación

Se partió de un cultivo con 150 x 10^6 epimastigotes en fase de crecimiento exponencial. Se cosecharon los mismos centrifugando el cultivo a 3000 rpm por 10 min. Se lavó el pellet de parásitos con 20 ml de medio BHT sin suero dos veces y finalmente se



resuspendieron en 300 µl de BHT frío en un tubo eppendorf. Se agregaron 50-70 µg del ADN plasmídico y se incubó 10 min en hielo. Se pasó el contenido a cubetas de electroporación previamente enfriadas, se lo sometió a un pulso de 335 V /24 Ω /1400 µF (Cte, 8 - 12) y se incubó en hielo durante 5 min. Por último, se pasaron los parásitos a botellas con 3 ml de medio BHT suplementado con 10% de SFB. A las 24 h se agregaron los antibióticos correspondientes para la selección de los parásitos transfectados.

Durante el lapso de selección (aproximadamente 30 días de comenzada la suplementación del medio con los antibióticos de selección) se mantuvo el cultivo en agitación moderada enriqueciendo las botellas con 1 ml de medio fresco semanalmente. Una vez concretado este tiempo se repicaron los cultivos como se describió previamente.

5.3. Técnicas analíticas de proteínas

5.3.1. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

Pellets de epimastigotes fueron resuspendidos en solución CB (*cracking buffer*, Anexo 2) 1X, a razón de 1×10^6 parásitos/µl, y calentados a baño María a 100 °C por 10 min y sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida 12% en condiciones desnaturalizantes por adición de 0,1% dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las muestras se sembraron a razón de 30 x 10⁶ epimastigotes por calle y se resolvieron aplicando 120 V durante 80 min en medio Running buffer (solución de Tris-Glicina-SDS, Anexo 2). Se utilizó PAGERuler (Thermo Fisher, EE. UU.) como marcador de peso molecular, el mismo cubre un rango de entre 17 y 200 kDa.

5.3.2. Ensayo de Western Blot por método de quimioluminiscencia

Una vez finalizado el SDS-PAGE se realizó la transferencia húmeda de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, EE. UU.). Se corroboró la correcta transferencia de las proteínas a la membrana mediante tinción con solución de Rojo Ponceau (Anexo 2). En los casos en los que se utilizó más de un anticuerpo la membrana de nitrocelulosa donde fueron transferidas las muestras fue recortada con el fin de que la proteína de interés y el control de carga queden separados, lo que permitió incubar ambos fragmentos de forma independiente con los anticuerpos correspondientes en cada caso. La membrana se incubó con solución de bloqueo (leche en polvo 5% en T-PBS, Tween Buffer fosfato salino



0.05%, Anexo 2), durante 1 h a RT. A continuación, se incubó ON a 4 °C en agitación con el anticuerpo primario correspondiente: anticuerpo policlonal anti-FLAG hecho en conejo (Sigma, EE. UU.), anticuerpo policlonal anti-glutamato deshidrogenasa de *T. cruzi* (GDh) hecho en conejo o anticuerpo policlonal anti-serina carboxipeptidasa de *T. cruzi* (SCP) hecho en conejo. Todos estos anticuerpos fueron diluidos 1:5000 en T-PBS 0,05% con 5% de leche en polvo. Luego de tres lavados de 10 min con T-PBS se incubó durante 2 h en agitación a RT con el mismo anticuerpo secundario correspondiente: anti-*rabbit* conjugado a HRP (Sigma, EE. UU.) 1:2500 en T-PBS 0,05% con 5% de leche en polvo. Se lavó la membrana tres veces durante 10 min con T-PBS y se le agregó una mezcla en partes iguales de sustrato quimioluminiscente Supersignal TM West (Thermo Fisher, EE. UU.) de sensibilidad media (pico) y alta (femto). Se registró la señal quimioluminiscente generada por exposición a placas radiográficas (Thermo Fisher EE. UU.) (Cámara *et al.*, 2017).

5.3.3. Ensayo de Western Blot por fluorescencia en infrarrojo, sistema Odyssey:

En este caso, luego de incubar la membrana con la solución de bloqueo (siguiendo el procedimiento previo explicado en el ítem anterior), se incubó ON con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG hecho en ratón (clon M2-Sigma, EE. UU.) diluido 1:5000 en solución de bloqueo (T-PBS con leche en polvo 1%). Transcurrido ese tiempo se lavó tres veces con T-PBS y se incubó con anti-IgG de ratón hecho en cabra acoplado a un cromóforo de absorción y emisión en el rojo lejano (IRDye 800CW, Li-cor, EE. UU.) utilizando una dilución de 1:20000 en solución de bloqueo. Las membranas se revelaron utilizando el sistema Odyssey (Li-cor) y se analizaron con el programa Image Studio (Li-cor, EE. UU.).

5.3.4. Ensayos de Inmunofluorescencia indirecta

Brevemente, alícuotas de los cultivos de parásitos en fase exponencial fueron contados de acuerdo con lo descrito y el volumen correspondiente a $5x10^6$ epimastigotes fue centrifugado a 3000 rpm por 10 min. El pellet se lavó con PBS (Anexo 2) filtrado y fue vuelto a centrifugar repitiendo este procedimiento tres veces. Luego de los lavados se resuspendió, a razón de lograr una concentración de $4x10^4$ parásitos/µl, en el volumen correspondiente de paraformaldehido (PFA) 4% en PBS. Se incubó la muestra por 30 min a RT. Se utilizó poli-L-lisina 0.01% (Sigma, EE. UU.) para adherir los epimastigotes fijados sobre vidrios portaobjetos.



Luego, para disminuir la fluorescencia basal de la muestra, se incubó con cloruro de amonio 25 mM en PBS durante 20 min. Se realizaron tres lavados con PBS y se incubó la muestra 5 min con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma, EE. UU.) 5% en PBS (PBSA) para bloquear interacciones inespecíficas. Se incubó durante 60 min con anticuerpo primario anti-FLAG hecho en conejo (Sigma, EE. UU.) diluido 1:5000 en PBSA. Luego de reiterados lavados con PBS se incubó la muestra con el anticuerpo secundario anti-rabbit Alexa-568 (Sigma, EE. UU.) diluido 1:500 en PBSA y con DAPI (10 μ g/ml) para la tinción del ADN nuclear y mitocondrial. Finalmente se aplicaron 2 μ l de medio de montaje FluorSave (CalBiochem) sobre la muestra y se colocó un cubreobjetos, sellando el espacio entre ambos vidrios con esmalte transparente. Las imágenes resultantes se obtuvieron con un microscopio de epi-fluorescencia Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara DS-Quil CCD (Tabla II) y fueron procesadas con el programa ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012).

MARCACIÓN	LONGITUD DE ONDA DE EXCITACIÓN	LONGITUD DE ONDA DE EMISIÓN	TARGET
Anticuerpo primario: anti-FLAG Anticuerpo secundario: anti- <i>rabbit</i> Alexa-568	535 nm	568 nm (Rojo)	Isoformas de TSSA etiquetadas con FLAG
DAPI	400 nm	461 nm (Azul)	ADN nuclear y mitocondrial (kDNA)
EGFP	470 nm	509 nm (Verde)	Fusión traduccional Cas9-EGFP

Tabla II: Se describen las distintas marcaciones realizadas a las muestras, la longitud de onda a la que fueron sometidas, los distintos elementos que fueron observados y los colores en los que fueron visualizados.

5.4. Técnicas de análisis *in silico*

5.4.1. Análisis bioinformático de secuencias

El software Vector NTI (Invitrogen, EE. UU.) se empleó como herramienta para el análisis y alineamiento de secuencias.



6. Resultados

6.1. Diseño de un plásmido derivado de pTEXL-EGFP para la expresión de las proteínas TSSA en *T. cruzi*

Con el objetivo de obtener un plásmido que permitiese la expresión moderada y constitutiva de las diferentes proteínas TSSA en T. cruzi se procedió a realizar una adaptación del vector pTEXL-EGFP (Bouvier et al., 2013). En particular, se trabajó con la versión de este plásmido que confiere resistencia a higromicina ya que las líneas de parásitos editadas ya presentaban resistencia a los antibióticos blasticidina y G418 como consecuencia del diseño del sistema CRISPR-Cas9 implementado para su generación (Balouz, 2020). La conformación original de pTEXL-EGFP incluye el gen codificante de la proteína EGFP cuya regulación transcripcional está determinada por regiones 5' y 3' no codificantes del gen GAPDH de T. cruzi y se encuentra flanqueado por los sitios de restricción para las enzimas BamHI y NotI, los cuales no resultaban compatibles para nuestros clonados. En base a esto, diseñamos un protocolo para reemplazar la secuencia de EGFP por un nuevo MCS que contuviese, además de los sitios BamHI y NotI originales, secuencias adicionales para la restricción con las enzimas XhoI, SalI y ClaI. Brevemente, se digirió el vector pTEXL-EGFP con las enzimas BamHI y NotI. Con el producto de esta reacción se realizó una electroforesis en gel de agarosa donde se identificaron dos fragmentos de tamaños aproximados de 5000 pb y 700 pb. Se purificó a partir del gel el fragmento de mayor peso molecular, correspondiente al vector (imágenes no incluidas). En paralelo, se realizó el apareamiento de los oligonucleótidos parcialmente complementarios que darían origen al nuevo MCS. La secuencia de estos oligonucleótidos hace que, al aparearse, generen un fragmento doble cadena que contiene en sus extremos la estructura de los sitios de restricción BamHI y NotI luego de la digestión por esas mismas enzimas (señalada en amarillo, Figura 9). Seguidamente se realizó la ligación de la secuencia con el fragmento de tamaño aproximado a 5000 pb recuperado a partir de la digestión del pTEXL-EGFP con BamHI y NotI obteniéndose el nuevo vector pTEXL-MCS (Figura 9).





Figura 9: Representación gráfica de la adaptación del vector pTEXL-EGFP para el clonado de proteínas TSSA. Se escindió del vector pTEXL-EGFP original el fragmento codificante para la proteína EGFP por medio de la digestión enzimática con BamHI y Notl. Posteriormente se ligó el nuevo MCS, generado por apareamiento de oligonucleótidos parcialmente complementarios, que contiene los sitios BamHI, XhoI, SalI, ClaI y NotI. Se obtuvo como resultado el plásmido pTEXL-MCS. Se muestra también el sitio de restricción para la enzima SacI, presente en el esqueleto del plásmido, utilizada posteriormente para confirmar el correcto clonado del nuevo MCS por doble digestión con XhoI.

Se transformaron bacterias *E. coli* competentes con el producto de la ligación, se sembraron en medio LB-agar suplementado con ampicilina y se incubaron ON a 37 °C. Con el objetivo de identificar los clones de interés, se analizaron 10 colonias por restricción con las enzimas SacI, presente en el esqueleto del plásmido pTEXL, y XhoI, presente en el nuevo MCS (Figura 9). En caso de haberse ligado exitosamente el nuevo MCS, los productos de digestión esperados eran dos fragmentos de un tamaño teórico estimado de 4987 pb y 463 pb. El producto de cada digestión se sembró, junto con un control conformado por la digestión del vector sin inserto (obtenido de un clon correspondiente a la placa realizada como control de religado), se resolvieron en un gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio. Como se observa en la Figura 10, las digestiones provenientes de las colonias 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 y 10 mostraron dos bandas discretas: una de entre 0,4 y 0,5 kpb y una segunda de más de 2 kpb, de tamaño equivalente al obtenido en el control de religado. Este patrón es compatible con la inserción del nuevo MCS en estas colonias. Contrariamente, las muestras derivadas de las colonias 5 y 7 mostraron un único producto de un tamaño levemente mayor al fragmento de mayor peso molecular observado en el resto de las colonias mencionadas y el control (Figura 10).





Figura 10: Análisis por restricción enzimática de los clones obtenidos como producto de la ligación entre el vector pTEXL y el nuevo MCS. Se sembraron en un gel de agarosa 1,5% los productos de digestión con las enzimas SacI y XhoI de 10 clones (colonias 1 a 10) y del plásmido pTEXL sin inserto. Los marcadores de peso molecular (en Kpb) se indica a la izquierda.

Ya que en el ensayo anterior mostraron un patrón electroforético compatible con la presencia del nuevo MCS, alícuotas de los plásmidos obtenidos a partir de las colonias 1 y 2 fueron secuenciadas con oligonucleótidos propios del vector pTEXL (pTEXL-Fw y pTEXL-Rv) para corroborar dicha hipótesis. La identidad entre las secuencias obtenidas y ensambladas con las secuencias teóricas esperadas, generadas *in silico* en el programa Vector NTI fue absoluta (alineamientos no incluidos en este trabajo). En base a estos resultados, decidimos seguir nuestro trabajo con el plásmido proveniente de la colonia 1, de aquí en adelante llamado pTEXL.

6.2. Diseño de genes TSSA sintéticos y construcción del vector de complementación

El objetivo central de este proyecto era generar las herramientas necesarias para restaurar la expresión de TSSA en parásitos editados para sus genes codificantes. Con la idea de agregar valor a nuestro trabajo, nos planteamos la complementación de estas líneas con 3 de las isoformas descritas para TSSA (TSSAI, TSSAII y TSSAIII), que muestran diferencias estructurales y funcionales entre ellas (ver Introducción). A la hora de diseñar la estrategia para



lograr tal fin nos vimos condicionados por el protocolo de edición implementado previamente en estas líneas de parásitos. Como se mencionó en la sección de antecedentes, la estrategia de edición de las líneas de *T. cruzi* sobre las cuales se trabajó en este proyecto (clones 3, 9 y 10) involucró el uso de cuatro sgARN diferentes (Figura 11), cada uno complementario a una región específica (*protospacer*) del gen TSSAII (Balouz, 2020).

Ya que los parásitos a complementar habían integrado en su genoma, y expresaban activamente la proteína Cas9 y los sgARN (ver más adelante), nos planteamos modificar las secuencias génicas codificantes de las distintas TSSA que usaríamos en nuestros constructos de modo tal de evitar que Cas9 las reconociera y eliminara una vez realizada la transfección. Por otro lado, como desconocemos cuál de los cuatro sgARN había sido incorporado en cada una de nuestras líneas editadas, al momento de diseñar los genes debimos insertar mutaciones puntuales en cada uno de los posibles sitios de reconocimiento. Cabe destacar que esta estrategia fue implementada en cada una de las secuencias codificantes para las tres isoformas de TSSA utilizadas en este trabajo ya que, a pesar de que originalmente Cas9 fue dirigida hacia TSSAII (Figura 3), los *protospacer* reconocidos por los cuatro sgRNA coincidían con sitios conservados entre las tres isoformas en estudio de esta proteína (Figura 1).

	PAM	4 P	AM 3						PAM 1	
TSSAI	ATGACTACGTCCCG			CGCTTGO	CCTGTGC	TGCTGCCTA	TCTGCGTGCA	CGACAGCGAA	TGGTGGGTCTACT	GT 93
TSSAII	ATGACTACGTCCCG	TCTGCTGTGCG	COTGTTC	CECTTEO	CCTGTGC	TGCTGCCTA			IGGIGGTCTACT	AGT 03
TECAIL	ATOCTACCTOCCO	TOTOCTOTOTO		COCTTOO	COTOTOT	TOOTOCOTA	TCTCCCTCCA			
ISSAIII	ATGUTACGTGCCG	TCTGCTGTGCG		CGCTIGC		IGUIGUUIA	TCTGCGTGCAG	JGACAGUGAA	IGGIGGGICIACI	411 93
		PROTOSPACER	t.4				P	ROTOSPACER 1		
			PRO	TOSPACER	3					
TSSAI	TCTACCCCACCT	-GGTACGGACA	A <mark>G</mark> AAAACAG	CT <mark>G</mark> CAGG	GG <mark>G</mark> AACT(CCATCTCCA	TCGGGAGCTT	CTTCAGGTGA	AGCAGAAGCCTCC	TCA 183
TSSAII	TCTACCCCACCTTC	TGGTACGGAAA	A <mark>TAAAC</mark> CAG	CT <mark>A</mark> CAGG	GG <mark>AAG</mark> CT(CCATCTC <mark>A</mark> A	CCGGGGGGCTT(CTTCAGGTGA	AGCAGAAGCCTCC	TCA 186
TSSAIII	TC TACCCCACCTTC	TGGTACGGAGA	A <mark>GAAAG</mark> CAG	CT <mark>G</mark> CAGG	GG <mark>AAG</mark> CT(CCATCTC <mark>C</mark> A	TCGGGAGCTT	CTTCAGGTGA	AGCAGAAGCCTCC	TCA 186
			PA	M 2						
TSSAI	AATAAGAATGACGG	CAGCCTCAGCA	GCTCTGCGT	GGGTGTT	TGCCCCG	CIGGCGCIC	GCCGCATCCG	GCTGGCGTA	CACCGCTCTGGGC	IGA 276
TSSAII	AATAAGAATGACGG	CAGCCTCAGCA	GCTCTGCGT	GGGTGAG	TGCCCCG	CTGGCGCTC	GCCGCATCCG	GCTGGCGTA	CACCGCTCTGGGC	TGA 279
TSSAIII	AATAAGAATGACGG	CAGCCTCAGCA	GCTCTGCGT	GEGTETT	TGCCCCG	CTEGECECTE	ACCGCATCCG	GCTGGCGTA	CACCGCTCTGGGC	TGA 279
		PROTOSE	PACER 2							

Figura 11: Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de TSSAI, TSSAII y TSSAIII. Se muestran las secuencias genómicas originales de cada isoforma de referencia de TSSA (Bhattacharyya *et al.*, 2010) marcando en naranja y azul los polimorfismos de secuencia presentes entre isoformas. Se indica la región correspondiente a cada uno de los cuatro *protospacer* utilizado durante la edición de los clones 3, 9 y 10, recuadrando su respectiva secuencia PAM. Se observa que las secuencias



correspondientes a cada *protospacer* se encuentran absolutamente conservadas entre las distintas isoformas de TSSA.

La estrategia implementada inicialmente fue la de introducir mutaciones silenciosas en las secuencias correspondientes al protospacer adjacent motif (PAM) ya que esto bastaría para inhibir la acción de la proteína Cas9 (Zheng et al., 2017). Por tratarse de mutaciones silenciosas, además, se mantendría intacta la secuencia de aminoácidos de la proteína. Basándonos en el código genético universal y teniendo en cuenta el marco abierto de lectura (ORF) de cada una de las distintas isoformas de TSSA (Figura 11), exploramos distintas combinaciones de nucleótidos que dieran origen a mutaciones silenciosas en el PAM de los protospacer. Esta estrategia fue viable únicamente para los protospacers 3 y 4, pero no para los protospacers 1 y 2 (Figura 12). El PAM del protospacer 2 (en orientación del sentido de traducción), en particular, está compuesto por el codón TGG, el único posible para la codificación del triptófano, por lo que no existe mutación sinónima factible (Figura 12). El PAM del protospacer 1 (también en orientación sentido), en cambio, incluye la T en tercera posición del codón GGT y las dos primeras posiciones del siguiente codón (GGG), ambos codificantes para el aminoácido Glicina (Figura 12). Al hacer el análisis, se vio que todas las combinaciones de codones posibles que codificaran para dos Glicinas consecutivas formaban un PAM de secuencia NGG, donde N corresponde a cualquiera de los 4 nucleótidos: A, C, G o T (Figura 12). El cambio de un único nucleótido ubicado en uno de los extremos del PAM (reemplazo del codón GGT por GGA, GGC o GGG) podría no ser suficiente para evitar el accionar de Cas9 (Zheng et al., 2017). En definitiva, para minimizar el apareamiento de los sgARN1 y sgARN2 sobre las TSSA generadas, se decidió incorporarles mutaciones sinónimas a lo largo de las secuencias contra las que alinean ambos sgARN, por fuera del PAM. En el caso de la región correspondiente al protospacer 2 se pudo incorporar un valor total de dieciséis mutaciones sinónimas (Figura 12.B.), por otro lado, este número se redujo a seis en el caso del protospacer 1 (Figura 12.A.). Dado el riesgo de que esta cantidad de mutaciones no bastara para evitar el apareamiento del sgARN1, se decidió introducir una mutación en el PAM del correspondiente protospacer a pesar de que esto implicaría un cambio en el aminoácido de dicha posición. Con la intención de minimizar el posible impacto de este cambio en los aspectos funcionales y/o estructurales de la proteína final, se reemplazó la segunda de estas Glicinas (Glicina 28 tomando como aminoácido 1 la Metionina de inicio de la traducción) por Serina,



un aminoácido estructuralmente relacionado a Glicina y muy prevalente en TSSA y en otras proteínas tipo mucinas de *T. cruzi* (Buscaglia *et al.*, 2006).

Α			Protosp	PA	M 1				
Secuencia de aminoácidos	Ala	Cys	Thr	Thr	Ala	Asn	Gly	Gly	
Secuencia original	GCG	TCG	ACG	ACA	GCG	AAT	GGT	GGG	
							GGC	GGC	
Análisis de codones sinónimos en	GCG	TCC	ACG		CCC	4 4 T	GGA	GGA	
PAM	GCG	ICG	LG ALG	ACA	GCG	AAI	GG <mark>G</mark>	GGT	
							N	GG	
Análisis de codones sinónimos en	GCC	TGT	ACA	ACG	GCA	AAC			
Analisis de codones sinonimos en	GCT		ACC	ACC	GCC		GGT	GGG	
proiospacer	GCA		ACT	ACT	GCT				
Mutaciones	1	2	1	1	1	1	0	0	Total
Nueva secuencia con mutación no	Ala	Cys	Thr	Thr	Ala	Asn	Gly	Ser	
silenciosa en PAM	GCG	TCG	ACG	ACA	GCG	AAT	GGT	TCT	

В	Protospacer 2							PAM 2
Secuencia de aminoácidos	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Ser	Ala	Тгр
Secuencia original	GGC	AGC	CTC	AGC	AGC	TCT	GCG	TGG
Nueva secuencia	GGT	TCG	TTG	TCG	TCG	AGC	GCC	TGG
Mutaciones	1	3	2	3	3	3	1	0

С	PAM 3*		Protospacer 3					
Secuencia de aminoácidos	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Cys
Secuencia original	GCC	C TG	TTG	GCG	CTT	GCC	CTG	TGC
Nueva secuencia	GCG	CTG	TTG	GCG	CTT	GCC	CTG	TGC

*PAM 3 en hebra no codificante pasa de GGG a GCG

D	PAM 4*		Protospacer 4						
Secuencia de aminoácidos	Cys	Arg	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ala
Secuencia original	TGC	CGT	CTG	CTG	TGC	GCC	CTG	TTG	GCG
Nueva secuencia	TGT	AG G	CTG	CTG	TGC	GCG	C TG	TTG	GCG
						PA	M 3		

*PAM 4 en hebra no codificante pasa de CGG a CTA

Figura 12: Variaciones incorporadas en las secuencias *protospacer* en los genes TSSA sintéticos. Se muestra la secuencia original tanto de aminoácidos como de nucleótidos y la secuencia mutada finalmente utilizada. Se resaltan en naranja las regiones correspondientes al PAM y en rojo los nucleótidos y aminoácidos involucrados. (A) Análisis del *protospacer* 1 incluyendo posibles mutaciones silenciosas y posibles combinaciones de codones alternativos resultantes. Se indica el total de mutaciones puntuales sinónimas posibles. Se muestra la secuencia con PAM mutado (mutación no sinónima) que fue finalmente utilizada en el diseño de los genes sintéticos. (B) Análisis del *protospacer* 2: Se indica el total de las mutaciones puntuales sinónimas incorporadas a lo largo del *protospacer* y la secuencia final resultante (C y D) Análisis de los *protospacer* 3 y 4. Se indican las variaciones incorporadas en la región PAM y, señalizada con un asterisco, su versión en la hebra no codificante



donde se localiza el PAM en estos casos.

Además de los ORF completos que codifican para las tres isoformas de TSSA (con las mutaciones descritas anteriormente), en el diseño de estos genes se incluyó una etiqueta antigénica (secuencia FLAG) que permite trazar su expresión y localización usando anticuerpos específicos. Esta secuencia se insertó en el *core* de TSSA, ya que debe estar presente en la proteína madura (luego del procesamiento post-traduccional que escinde las secuencias del péptido señal y de anclaje por GPI), muy próxima a la posición de adición del lípido (Figura 13.A. y B.). Antecedentes de nuestro laboratorio indican que la inserción de la secuencia FLAG en este sitio no genera interferencias en la migración y anclaje de moléculas de superficie de *T. cruzi* (Cámara *et al.*, 2017; Balouz *et al.*, 2019). Las secuencias finales de cada isoforma de TSSA (TSSAI, II y III) fueron flanqueadas por sitios de restricción para las enzimas XhoI y NotI, los cuales nos serían funcionales al momento de clonarlas en el vector de complementación. (Figura 13.C.).

A





UAD

Figura 13: Estructura y secuencia de los genes sintéticos para isoformas de TSSA. (A) Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de los genes originales de cada isoforma de TSSA, de los genes con la adición de la etiqueta antigénica FLAG y de las secuencias finales sintetizadas, con la etiqueta antigénica FLAG y las mutaciones incorporadas para evadir el reconocimiento de la nucleasa Cas9. Se indica en la imagen la región correspondiente al FLAG y a cada protospacer. Se pueden observar las variaciones de nucleótidos incorporados en los protospacers. Las variaciones presentes por fuera de los protospacers corresponden a los polimorfismos de secuencia entre las distintas isoformas de TSSA. Se incluyen señalizados en amarillo y verde los sitios de restricción para las enzimas SpeI y PstI respectivamente. (B) Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas deducidas a partir de los genes originales de cada isoforma de TSSA y, debajo, de las secuencias finales sintetizadas. Se indica la región correspondiente al epítope FLAG y con una flecha la única mutación no sinónima incorporada en el diseño. El resto de las variaciones presentes corresponden a los polimorfismos de secuencia entre las distintas isoformas de TSSA. (C) Representación esquemática del diseño general de los genes sintéticos de TSSA compuesto por un péptido señal (SP), una región core conteniendo la etiqueta antigénica FLAG y la secuencia codificante del anclaje GPI. Flanqueando, se encuentran los sitios de restricción para las enzimas XhoI y NotI.

Los genes de TSSA sintéticos fueron recibidos incorporados en un plásmido comercial (pTOP Blunt V2) con resistencia a ampicilina. Estos plásmidos fueron amplificados



en bacterias *E. coli* DH5αF crecidas en medio LB suplementado con dicho antibiótico. El ADN plasmídico fue purificado y sometido a una digestión preparativa con las enzimas XhoI y NotI, que reconocen los sitios de restricción flanqueantes agregados en el diseño (Figura 13.C). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el producto de esta digestión obteniéndose en cada caso dos fragmentos, uno de ~3500 pb correspondiente al vector pTOP Blunt V2, y otro de ~300 pb correspondiente al gen TSSA sintético (Figura 14.A.). Los fragmentos de menor peso molecular se purificaron a partir del gel y se subclonaron en el vector pTEXL previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (Figura 14.B.).



Figura 14: Clonado de genes TSSA sintéticos en el vector pTEXL. (A) Digestión enzimática de los plásmidos pTOP Blunt V2 conteniendo las distintas TSSA con XhoI y NotI. (B) Generación del plásmido pTEXL aceptor para los insertos de TSSA mostrados en (A). En la primera calle se observa un único producto de ~5,5 kpb correspondiente al vector pTEXL digerido con las enzimas XhoI y NotI y en la segunda calle el mismo plásmido sin digerir.

Los productos de ligación de cada una de las TSSAs con el vector pTEXL, junto a un control de religación sin adición de inserto, fueron analizados por restricción usando las enzimas XhoI y NotI (datos no mostrados). Aquellos clones que liberaron un fragmento de



~300 pb (correspondiente al inserto de TSSA) fueron considerados positivos. De cada ensayo de ligación se seleccionó un clon positivo con el objetivo de corroborar su identidad. Para ello diseñamos un ensayo de tipificación del tipo *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP) (Figura 15.A.). Este protocolo de RFLP se basa en la utilización de las enzimas de restricción SpeI y PstI las cuales generan distintos patrones de corte según la isoforma que se encuentre insertada en cada vector. El vector pTEXL contiene en su esqueleto una secuencia de corte para cada una de estas enzimas y cada una de las TSSAs presentan alternativamente un sitio de corte para SpeI, PstI o ambas (Figura 13.A. y 15.A.). Más específicamente, PstI reconoce la secuencia 5'-CTGCAG-3', presente dos veces en los plásmidos pTEXL-TSSAI y pTEXL-TSSAII y una sola vez en plásmido pTEXL-TSSAII. Por otra parte, SpeI reconoce la secuencia 5'-ACTAGT-3', presente dos veces en los plásmidos pTEXL-TSSAI y una vez en el plásmido pTEXL-TSSAII (Figura 13.A y 15.A).

Con el objetivo de tipificar la isoforma de TSSA clonada en cada uno de los plásmidos, se tomó una alícuota de cada uno y del plásmido pTEXL, a modo de control, y se digirieron con las enzimas mencionadas. Luego de la incubación correspondiente los productos de cada reacción se resolvieron en un gel de agarosa. Respecto a las digestiones realizadas con PstI, tanto el plásmido pTEXL como el pTEXL-TSSAII presentaron un único producto de ~5,0 kpb atribuible a la linearización de los mismos, de acuerdo con lo esperado. Las digestiones correspondientes a los plásmidos pTEXL-TSSAI y pTEXL-TSSAIII presentaron dos productos: uno de ~4,0 kpb y otro de entre 1,0 y 1,5 kpb, ambos congruentes con los dos fragmentos teóricos predichos (Figura 15.B.). Respecto a las digestiones realizadas con la enzima SpeI, los plásmidos pTEXL y pTEXL-TSSAII presentaron un único producto de digestión de más de 2,0 kpb, de acuerdo con lo esperado (Figura 15.C.). Las digestiones correspondientes a los plásmidos pTEXL-TSSAI y pTEXL-TSSAII presentaron dos productos predichos (Figura 15.C.). A modo de confirmación, los tres clones tipificados se secuenciaron corroborando su correcto clonado e identidad (resultados no mostrados).





Figura 15: Tipificación del tipo RFLP del clonado de genes TSSA en el vector pTEXL. (A) Esquema representativo de los sitios de restricción reconocidos por las enzimas SpeI y PstI en los plásmidos pTEXL, pTEXL-TSSAI, pTEXL-TSSAII y pTEXL-TSSAIII y los tamaños esperados de los fragmentos luego de su digestión enzimática. (B, C) Electroforesis en geles de agarosa de los productos obtenidos por la digestión enzimática de estos plásmidos con PstI (B) y SpeI (C).



6.3. Transfección y evaluación de la expresión de las distintas TSSAs en las líneas de parásitos editadas con CRISPR-Cas9

Los vectores pTEXL-TSSAI, pTEXL-TSSAII y pTEXL-TSSAIII, una vez amplificados y purificados, fueron utilizados para realizar transfecciones en cada una de las líneas editadas y en la cepa RA *wt* parental. Como control, estas mismas líneas fueron transfectadas en paralelo con el vector pTEXL. Luego de la recuperación y selección de los parásitos por un periodo de 30-45 días con los antibióticos correspondientes se obtuvieron en total dieciséis nuevas líneas celulares: clon 3 pTEXL-TSSAI, clon 3 pTEXL-TSSAII, clon 3 pTEXL-TSSAIII, clon 9 pTEXL-TSSAI, clon 9 pTEXL-TSSAII, clon 9 pTEXL-TSSAII, clon 10 pTEXL, clon 10 pTEXL







Para evaluar la expresión de las proteínas TSSA en las líneas celulares obtenidas, se realizaron primeramente ensayos de Western Blot sobre muestras de lisados totales de parásitos creciendo vigorosamente (en fase exponencial). Como control de carga en los ensayos iniciales se utilizó la proteína glutamato deshidrogenasa de *T. cruzi* (GDh, ~55 kDa). Esta proteína se encuentra presente, y en cantidades abundantes, en todos los estadios de desarrollo



del parásito, y ya ha sido utilizada con el mismo propósito en bibliografía (Urban *et al.*, 2011). El anticuerpo policional anti-GDh usado en este experimento reveló, además de una señal de ~55 kDa, compatible con la proteína GDh, señales correspondientes a productos de menor peso molecular, que podrían ser atribuidas a la degradación parcial de las muestras y/o a reacciones inespecíficas (Figura 17.A., panel superior). Por esta razón, en ensayos posteriores decidimos detectar la proteína serina carboxipeptidasa (SCP, ~70 kDa) de *T. cruzi* como control de carga entre las muestras (Urban *et al.*, 2011). A pesar de visualizar en algunos casos señales correspondientes a productos de peso molecular menor al esperado, este último anticuerpo demostró ser más apropiado (Figura 17.B., C y D, paneles superiores).

Para la detección de las distintas isoformas de TSSA se realizó una marcación primaria con un anticuerpo policional anti-FLAG de conejo y un anti-IgG total de conejo acoplado a HRP como anticuerpo secundario. Cabe destacar, como se mencionó anteriormente, que la proteína TSSA endógena sólo se expresa en el estadio tripomastigote (Di Noia et al., 2002). La expresión ectópica de las TSSA transfectadas, sin embargo, se esperaba que estuviese constantemente activa, ya que se encuentra regulada por el promotor constitutivo de GAPDH, propio del vector pTEXL. Al revelar las membranas por quimioluminiscencia, observamos señales compatibles con proteínas de entre 15 - 25 kDa en las líneas clon 3 pTEXL-TSSAII, clon 3 pTEXL-TSSAIII, clon 9 pTEXL-TSSAII, clon 9 pTEXL-TSSAII, clon 10 pTEXL-TSSAI, clon 10 pTEXL-TSSAII, clon 10 pTEXL-TSSAIII, RA pTEXL-TSSAI, RA pTEXL-TSSAII y RA pTEXL-TSSAIII (Figura 17). Este patrón complejo, integrado por moléculas de diferentes pesos moleculares aparentes, es compatible con la presencia de modificaciones posttraduccionales (y particularmente glicosilaciones) de las proteínas. En ese sentido, cabe destacar que todas las TSSA muestran sitios predichos de glicosilación y/o fosforilación según algoritmos bioinformáticos (Di Noia, 2002). Las líneas derivadas de clones 3 y 9 transfectadas con pTEXL-TSSAI no mostraron presencia de la proteína. En las líneas control (transfectadas con el plásmido pTEXL) y en las líneas sin transfectar, y acorde con lo esperado, no se observó señal correspondiente con la presencia de proteínas etiquetadas con FLAG.





Figura 17: Análisis de la expresión de las proteínas TSSA recombinantes medida por Western Blot revelado por quimioluminiscencia. Se sembraron muestras de epimastigotes correspondientes a las líneas obtenidas en este trabajo. (A) Clon 10 y RA, ambas transfectadas con pTEXL-TSSAII y pTEXL-TSSAIII junto a la cepa RA sin transfectar. (B) Clon 10 y RA ambas transfectadas con pTEXL-TSSAI y pTEXL. (C) Clon 9 transfectada con pTEXL-TSSAI, pTEXL-TSSAII y pTEXL. Clon 3 transfectada con pTEXL-TSSAI, pTEXL-TSSAII y pTEXL. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda (en kDa). A la derecha de cada panel se indica el anticuerpo primario con el cual se realizó el ensayo: anti-FLAG para la detección de TSSA y anti-SCP o anti-GDh como controles de carga. En todos los casos se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos en al menos 3 ensayos independientes.

Algunos de los ensayos de Western Blot fueron replicados usando un sistema de detección alternativo, basado en el método de fluorescencia en infrarrojo (Odyssey). En este caso se ensayaron solamente las líneas RA, clon 9 y clon 10 transfectadas con pTEXL-TSSAII, pTEXL-TSSAIII y pTEX. Para la detección de las diferentes TSSA por Odyssey, se realizó una marcación primaria con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG obtenido en ratón y un anti-IgG



total de ratón obtenido en cabra (conjugado a su vez con un fluoróforo de emisión en el infrarrojo, Tabla II) como anticuerpo secundario. Como control de carga y de transferencia, se realizó la tinción previa de las membranas con Rojo Ponceau (Figura 18). Como era de esperar, los resultados obtenidos fueron muy similares a los reportados usando el método de revelado por quimioluminiscencia, aunque el nivel de resolución fue mayor (Figuras 17 y 18). Brevemente, al revelar con el anticuerpo anti-FLAG, en las líneas transfectadas con pTEXL-TSSAII y pTEXL-TSSAIII se observaron señales compatibles con proteínas de un peso molecular aparente de entre 15 y 25 kDa, ausentes en las líneas control. El patrón obtenido para ambas isoformas está formado por señales correspondientes a diferentes pesos moleculares, los cuales en algunos casos se hacen más evidentes como en las líneas RA pTEXL-TSSAII, clon 10 pTEXL-TSSAII, C10 pTEXL-TSSAIII y C9 pTEXL-TSSAII. Tal como se mencionó anteriormente, este patrón (de tipo chorreado en vez de bandas discretas) es compatible con la expresión simultánea de moléculas mostrando heterogeneidades en sus modificaciones posttraduccionales. También en todos los casos se observó que, a pesar de que para ambas isoformas se predice un peso molecular muy similar, la isoforma TSSAII presenta una menor migración en geles SDS-PAGE. Esto podría atribuirse a diferencias en las propiedades físico-químicas y/o en el procesamiento post-traduccional de las isoformas. Si bien ambas hipótesis son posibles, favorecemos la primera ya que resultados similares fueron obtenidos al expresar isoformas de TSSA en bacterias (De Marchi, 2011; Balouz et al., 2015). En lo que respecta al nivel de expresión, se obtuvieron diferentes intensidades intra- e inter- línea/isoforma, sin embargo, estos ensayos no fueron diseñados para realizar una cuantificación fehaciente de estas diferencias. Por último, debe mencionarse que el anticuerpo anti-FLAG reveló señales en el rango de los 40 y 55 kDa en todas las muestras analizadas. Si bien la identidad de estas especies reactivas no fue determinada, el peso molecular aparente de las mismas y, sobre todo, el hecho de que también fueron encontradas en las líneas control (parásitos transfectados con pTEXL) indica que no están asociadas a la expresión de las TSSAs (Figura 18).









Figura 18: Análisis de la expresión de las proteínas TSSA recombinantes medida por Western Blot revelado por sistema Odyssey. Se muestran imágenes representativas de numerosos ensayos de resultados similares (A-C) Tinción Rojo Ponceau de las membranas de nitrocelulosa (paneles de la izquierda) y análisis de Western Blot usando un anticuerpo anti-FLAG (paneles de la derecha) de parásitos RA *wt* (A), del clon 10 (B) y del clon 9 (C) transfectados con pTEXL, pTEXL-TSSAII y pTEXL-TSSAIII. Los marcadores de peso molecular (en kDa) se indican a la izquierda.

Como parte del análisis de expresión de las proteínas TSSA en las líneas generadas, se realizaron ensayos de IFI (Figura 19). Muestras de epimastigotes en fase exponencial del crecimiento fueron fijadas y adheridas a vidrios portaobjetos. Al tratarse del estudio de una proteína de superficie, la manipulación de las muestras durante el procedimiento se llevó a cabo cuidadosamente con el objetivo de mantener la integridad de la membrana de los epimastigotes. La detección de TSSA se realizó mediante una marcación primaria con un anticuerpo policional anti-FLAG hecho en conejo, siempre en condiciones 'no permeabilizantes' (Balouz *et al.*, 2019). Bajo el microscopio de fluorescencia las isoformas de TSSA fueron visualizadas en rojo brillante debido al uso de un anticuerpo secundario acoplado a Alexa-568. Cabe destacar que la elección de este último se basó en el color de su fluorescencia, era primordial que el mismo fuese distinto y fácilmente distinguible del color verde proveniente de la fusión Cas9-EGFP intrínseco en las líneas sometidas a edición génica (Balouz, 2020). Las muestras fueron además tratadas con DAPI que, al intercalarse en la doble hebra de ADN, permite su visualización posibilitando la identificación de las estructuras



correspondientes al núcleo celular y kinetoplasto de los parásitos. Finalmente, se analizaron las distintas marcaciones realizadas en las líneas usando un microscopio de fluorescencia, se tomaron imágenes de cada una de ellas y se analizaron y procesaron para su presentación usando el software ImageJ. (Figura 19).

En todas las líneas la marcación con DAPI permitió evidenciar dos estructuras: una redondeada difusa y otra ovalada más brillante, muy cercana al sitio de emergencia del flagelo. Estas coinciden con las correspondientes al núcleo y kinetoplasto celular, respectivamente, y su localización relativa en la célula es la característica del estadío epimastigote (Balouz, 2020). Todas las muestras derivadas de líneas editadas emitieron señal correspondiente a la proteína Cas9-EGFP, la cual se localizó principalmente en un cúmulo discreto de posición central en la célula. Al superponer estas imágenes con las correspondientes a la señal emitida por DAPI se observó que la señal más prevalente de Cas9-EGFP coincidía con la localización del núcleo celular.

Respecto a la proteína de interés, todas las líneas complementadas de RA y el clon 10 emitieron señales correspondientes con las proteínas TSSA exógenas. En cuanto a los clones 3 y 9, sólo fue posible observar esta marcación en las líneas transfectadas con pTEXL-TSSAII y pTEXL-TSSAIII. En contraste, no se visualizó ningún tipo de señal atribuible a TSSAI en las líneas clon 3 pTEXL-TSSAI y clon 9 pTEXL-TSSAI, coincidente con lo observado en los ensayos de Western Blot (Figura 17 y 18). Es importante destacar que todas las líneas que expresaron exitosamente las isoformas de TSSA mostraron un patrón similar de distribución, puntillado y uniformemente extendido sobre la totalidad del cuerpo celular y el flagelo de los parásitos. En contraste, las líneas control de los clones 3, 9 y 10, de acuerdo con lo esperado, no mostraron señal correspondiente con la presencia de las proteínas TSSA



		DAPI	Cas9-EGFP	anti-FLAG (TSSA)	DIC* /DAPI/ anti-FLAG (TSSA)
	pTEXL	÷		Å	Ø
Clon 3	pTEXL-TSSAI	*		Ś	K
	pTEXL-TSSAII	*	× ø		~
	pTEXL-TSSAIII	•	E.		
Clon 9	pTEXL		1999),		
	pTEXL-TSSAI	. *	* *		
	pTEXL-TSSAII	•	j ^{ere} n	SP	Joe .
	TEXL-TSSAIII		· 1990		L





Figura 19: Análisis de la expresión y localización subcelular de las proteínas TSSAs en líneas de parásitos transfectados. Se muestran imágenes obtenidas a partir de marcaciones con DAPI (azul) y anti-FLAG (rojo) para visualizar la expresión de las isoformas de TSSA. En las líneas derivadas de los clones 3, 9 y 10, se visualizó, además, la presencia de Cas9 asociada a EGFP. En los paneles de la derecha se muestra la superposición de las señales lumínicas con una imagen de fase de los parásitos.



7. Discusión y conclusión

Múltiples ensayos bioquímicos (Cánepa et al., 2012) y de sobreexpresión homóloga (Cámara et al., 2017) sugieren fuertemente que la proteína TSSAII está involucrada en el proceso de reconocimiento, adhesión e internalización de tripomastigotes de T. cruzi hacia la célula huésped. Para evaluar esta hipótesis usando una aproximación genética, en nuestro laboratorio se logró editar genéticamente los loci TSSA de parásitos de la cepa híbrida RA mediante el método CRISPR-Cas9. Como consecuencia, se obtuvieron tres líneas parasitarias: el clon 3, con deleción parcial del locus TSSAII y el locus TSSAIII intacto, el 10 con deleción total del locus TSSAIII y del tándem completo de genes TSSAII y el clon 9 en el cual, además de presentar una deleción total de ambos *loci* de TSSA, se identificaron rearreglos relacionados posiblemente con el proceso de reparación post-edición génica (Figura 4) (Balouz, 2020). Distintos ensayos de infección (en monocapas de células Vero, en un modelo de esferoides celulares y en animales de experimentación) mostraron una disminución significativa en la capacidad infectiva de los tripomastigotes de los clones 9 y 10; mientras que los tripomastigotes del clon 3, mantuvieron niveles comparables con los de la cepa parental (Balouz, 2020). A priori, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente (Canepa et al., 2012; Cámara et al., 2017), la virulencia atenuada de los clones 9 y 10 podría ser en principio atribuida a la ausencia de la proteína TSSA. En ese marco, nos propusimos generar un modelo de complementación funcional de las líneas editadas de manera tal de evaluar el impacto del restablecimiento de la expresión de TSSA en el fenotipo de cada uno de los clones (clon 3, 9 y 10). Los ensayos de complementación funcional son normalmente utilizados en el proceso de caracterización de organismos mutantes generados por genética reversa; y son particularmente necesarios en casos como el nuestro dónde tecnologías CRISPR-Cas9, propensas a ediciones off target, son utilizadas (Zhang et al., 2015). Estas nuevas líneas complementadas permitirían corroborar si el restablecimiento de la expresión de TSSA en cultivos independientes, derivados de cada uno de los clones, revertía la atenuación fenotípica de los parásitos. También, dado el carácter polimórfico de TSSA (Balouz et al., 2021), nos planteamos aprovechar estos ensayos para explorar el impacto funcional de las variaciones naturales de esta molécula.

En esta Tesina, desarrollamos las herramientas moleculares (genes sintéticos de distintas isoformas de TSSA, plásmidos de expresión en *T. cruzi*) y celulares (líneas de parásitos con expresión apropiada de las distintas TSSAs) necesarias para poder llevar adelante los



ensayos de complementación funcional. En una primera etapa trabajamos en la obtención del vector más adecuado para lograr la transfección y posterior expresión de los genes de interés. Basándonos en la necesidad de un mecanismo de selección distinto al ya incorporado en las líneas editadas (resistentes a Blasticidina y a G418) (Balouz, 2020) decidimos usar como punto de partida la versión del vector pTEXL que otorga resistencia a higromicina. Previo a su utilización debimos implementar ciertas modificaciones acordes a nuestro objetivo. Primeramente, eliminamos el gen de expresión para EGFP y en su lugar insertamos un nuevo MCS, diseñado de acuerdo a nuestra conveniencia. Si bien la fusión a EGFP es ampliamente utilizada para el monitoreo de la expresión homóloga o heteróloga de genes y tiene la ventaja adicional de no necesitar de ensayos inmunoenzimáticos para su visualización, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que esta molécula no es aconsejable para etiquetar proteínas de superficie de *T. cruzi* (y organismo relacionados); quizás porque su tamaño (~30 kDa) o estructura compacta interfiere con el alto grado de ordenamiento y/o empaquetamiento de las mucinas (Cánepa *et al.*, 2012; Mucci *et al.*, 2017; Böhme y Cross, 2002).

Luego nos propusimos el diseño de genes sintéticos codificantes de las distintas isoformas de TSSA: TSSAI, TSSAII y TSSAIII. Considerando que las líneas editadas expresaban constitutivamente la proteína Cas9, nos vimos forzados a incorporar mutaciones puntuales en las secuencias correspondientes a los protospacers usados como target durante el protocolo de edición génica. En un primer momento nos planteamos incorporar únicamente mutaciones silenciosas en estas secuencias. Más precisamente, pensamos restringirlas a la porción correspondiente al PAM de los distintos protospacers, ya que esta región es clave para el reclutamiento de la nucleasa Cas9 al sitio de edición (Zheng et al., 2017). Sin embargo, al analizar las secuencias resultantes advertimos que esta estrategia sólo sería factible en el caso del PAM de los protospacer 3 y 4. Ante la imposibilidad de incorporar mutaciones silenciosas sobre el PAM del protospacer 2 optamos por incorporar múltiples mutaciones silenciosas (doce mutaciones en total) a lo largo de toda su secuencia, manteniendo intacta la región correspondiente al PAM. En el caso del protospacer 1, al no resultar esto factible (solo era posible incorporar seis mutaciones), decidimos realizar una mutación no sinónima en dicho PAM que generaría el cambio de un único aminoácido (Serina en lugar de la Glicina natural) en la posición veintiocho de la secuencia core final de la proteína. La elección del aminoácido Serina en lugar de la Glicina original se fundamenta en las similares propiedades químicas entre



estos residuos y en la prevalencia de Serina en TSSA y en otras proteínas del tipo mucina de *T. cruzi* (Buscaglia *et al.*, 2006). La posición modificada, además, se encuentra distante a los sitios mapeados en TSSAII como los involucrados en la interacción con la célula huésped (Cámara *et al.*, 2017) y, por lo tanto, es poco probable que afecte sus propiedades adhesivas. Debe también mencionarse, sin embargo, que i) la mutación incorporada se encuentra bastante cercana al sitio de clivaje del SP (predicho entre la Asparagina 26 y la Glicina 27) (Di Noia *et al.*, 2002) y ii) que la introducción de una nueva Serina podría alterar el perfil de O-glicosilación y/o fosforilación de esta molécula.

Con el propósito de poder identificar indirectamente a las TSSA exógenas, Se añadió también en este diseño la secuencia codificante para el epítope FLAG. La posición de esta etiqueta antigénica se basó en antecedentes que demuestran que su inserción (al menos en la posición relativa elegida) no interfiere en el procesamiento (entrada a vía secretoria, disposición en membrana, etc.) ni en la funcionalidad de TSSA en ensayos *in vitro* (Cámara *et al.*, 2017).En definitiva, si bien las modificaciones en la secuencia de los genes sintéticos fueron mínimas, e introducidas siguiendo un criterio racional y antecedentes empíricos, el verdadero impacto estructural y funcional de estas alteraciones es un punto a tener en cuenta al momento de evaluar los resultados de futuros análisis de complementación funcional en tripomastigotes.

A partir de estos genes sintéticos, se generaron los vectores que permitirían la expresión de las distintas isoformas de TSSA en parásitos transfectados. El subclonado direccionado de los constructos en el vector pTEXL, previamente generado, se realizó usando los sitios de restricción para las enzimas XhoI y NotI presentes en el nuevo MCS y flanqueantes a los genes sintéticos. Una vez chequeada su identidad por ensayos de RFLP y secuenciación, estos constructos (llamados pTEXL-TSSAI, pTEXL-TSSAII y pTEXL-TSSAIII), y el plásmido control (pTEXL), fueron transfectados en epimastigotes de las líneas del clon 3, clon 9 y clon 10. Como control adicional estos constructos fueron también transfectados en epimastigotes de la línea RA *wt*, cepa parental de las líneas editadas, obteniéndose un total de dieciséis nuevas líneas transfectadas. La selección de los cultivos resultantes se llevó a cabo suplementando el medio con un conjunto de tres antibióticos: Blasticidina y G418, resistencias propias del mecanismo de edición, e higromicina responsable de la selección de nuestro vector. Una vez transcurrido el periodo de selección y establecidos los cultivos, los mismos se



comenzaron a repicar semanalmente utilizando estas oportunidades para tomar muestras y evaluar la expresión de las proteínas de interés por Western Blot e inmunofluorescencia.

Mediante diferentes aproximaciones se caracterizó la expresión de los constructos basados en TSSA en las diferentes líneas generadas en el estadio de epimastigote. Sistemáticamente las proteínas obtenidas mostraron patrones electroforéticos complejos, integrados por moléculas de diferentes pesos moleculares, compatibles con la presencia de modificaciones post-traduccionales. Cabe remarcar que TSSA está codificado por un gen del tipo mucina y diferentes algoritmos bioinformáticos indican la presencia de sitios susceptibles a la modificación por glicosilación y/o fosforilación (Di Noia, 2002). Sin embargo, las evidencias experimentales muestran que la proteína TSSA endógena expresada en el estadio de tripomastigote (al menos la isofoma TSSAII) no parece estar abundantemente glicosilada (Cámara et al., 2017). En este sentido, cabe mencionar que la sobre-expresión homóloga de TSSAII en epimastigotes de las cepas CL Brener y Silvio X-10 de T. cruzi originó un patrón electroforético similar al obtenido en este trabajo, el cual se revirtió al ciclar los parásitos, recuperando su perfil típico en estadio infectivo del mamífero (Cámara et al., 2017). Respecto a su localización, todas las TSSAs mostraron un patrón similar de distribución: puntillado y extendido sobre la totalidad del cuerpo celular y el flagelo en la superficie del parásito. Esta disposición, característica de las proteínas de superficie de T. cruzi (Mucci et al., 2017; Campetella et al., 2020), concuerda con el observado al realizar esta técnica sobre epimastigotes de las cepas CL Brener y Silvio X-10 sobre-expresando TSSAII, y también con la distribución de la TSSA endógena en tripomastigotes wt (Cámara et al., 2017).

En conjunto, las mutaciones introducidas en la secuencia de las diferentes TSSAs y las construcciones obtenidas posteriormente, derivadas del vector pTEXL-EGFP, permitieron la expresión de los genes TSSA en *backgrounds* genéticos mutantes (es decir, modificados por y en presencia de la nucleasa Cas9), y también el correcto procesamiento de las proteínas (procesamiento de señales de secreción, localización en membrana). Sin embargo, dos líneas no expresaron la proteína TSSAI: clon 3 pTEXL-TSSAI y clon 9 pTEXL-TSSAI. La exitosa expresión de TSSAI en otras líneas (clon 10 pTEXL-TSSAI y RA pTEXL-TSSAI) indica que esta ausencia no está asociada a una falencia en el diseño o secuencia particular de este vector, sino a su interacción con el *background* genético o particularidades intrínsecas de cada línea; por ejemplo, la presencia de un sgARN que reconozca TSSAI (y no TSSAII y



TSSAIII) en los clones 3 y 9. A pesar de no tener información acerca del *protospacer* blanco del clon 3, la secuenciación genómica del clon 9 mostró que el sgARN responsable de la edición en esta línea es correspondiente al *protospacer* 1 (Balouz, 2020). Independientemente de cada caso en particular, ninguna de las secuencias elegidas en este trabajo como *protospacer* presenta polimorfismos entres isoformas que puedan explicar una susceptibilidad diferencial de TSSAI respecto de sus variantes TSSAII y TSSAIII (Figura 13). Más aún, mediante nuevos ensayos de transfección y caracterización, recientemente hemos obtenido las líneas clon 3 pTEXL-TSSAI y clon 9 pTEXL-TSSAI.

En conclusión, a partir de un diseño experimental exhaustivo y utilizando estrategias basadas en bioinformática, biología molecular, microbiología, bioquímicas e inmunoquímica, se obtuvieron las herramientas moleculares y celulares necesarias para la complementación funcional de las líneas mutantes de TSSA. Estos estudios, que incluyen el ciclado y análisis fenotípico de las líneas aquí generadas (y que lamentablemente no llegamos a completar durante este trabajo de Tesina debido a las restricciones impuestas por la pandemia), se encuentran actualmente en curso.



8. Anexos:

8.1. Anexo 1: Abreviaturas

3D: Tridimensional.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

BHT: (Brain Heart Tryptose) Triptosa de cerebro y corazón.

BSA: (Bovine Serum Albumin) Albúmina sérica bovina.

CB: (Cracking Buffer) Buffer de desnaturalización.

CFSE: (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*) Éster de succinimidil-carboxifluoresceína.

CRISPR: (<u>*Clustered <u>Regularly</u> <u>Interspaced <u>Short Palindromic</u> <u>Repeats</u>) Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas.</u>*</u>

DAPI: (4',6-<u>dia</u>midino-2-<u>p</u>henyl<u>i</u>ndole) 4',6-diamino-2-fenilindol.

DIC: (*Differential Interference Contrast Microscopy*) Microscopía de contraste de interferencia diferencial.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DO: Densidad óptica.

DTUs: (Discrete Typing Units) Unidades discretas de tipificación.

EDTA: (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) Ácido etilendiaminotetraacético.

EGFP: (<u>Enhanced Green Florescent Protein</u>) Proteína verde fluorescente mejorada.

Fw: *Forward*.

GDh: Glutamato deshidrogenasa.

GPI: (*GlycosylPhosphatidylInositol*) Glicosilfosfatidilinositol.

HRP: (Horseradish Peroxidase) Peroxidasa de rábano.

h: Hora(s).

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

kDa: Kilodalton.

kDNA: ADN mitocondrial.

KO: Knockout.

kpb: Kilo pares de bases.

LB: (Lysogeny Broth) Medio de cultivo Luria-Bertani o de lisogenia.



MASPs: (<u>Mucin-Associated Surface Proteins</u>) Proteínas de superficie asociadas a mucinas. MCS: (<u>Multiple Cloning Site</u>) Sitio de clonado múltiple.

min: Minuto(s).

ml: Mililitro(s).

ng: nanogramo(s).

nm: nanómetro(s).

ON: (*Over Night*) Durante la noche.

ORF: (*Open <u>R</u>eading <u>F</u>rame*) Marco abierto de lectura.

PacBio: Pacific Biosciences.

PAGE: (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PAM: (<u>Protospacer Adjacent Motif</u>) motivo adyacente al protospacer.

pb: Pares de Bases.

PBS: (<u>*Phosphate-Buffered Saline*) Buffer fosfato salino.</u>

PCR: (*Polymerase Chain Reaction*) Reacción en cadena de la polimerasa.

PFA: Paraformaldehído.

RCF: (<u>*Relative Centrifugal Force*)</u> Fuerza centrífuga relativa.

RFLPs: (<u>*Restriction Fragment Length Polymorphism*) Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción.</u>

rpm: Revoluciones por minuto.

RT: (*Room Temperature*) Temperatura ambiente.

Rv: Reverse.

SCP: Serina carboxipeptidasa.

SDS: (*Sodium Dodecyl Sulfate*) Dodecilsulfato sódico.

SFB: Suero fetal bovino.

sgARN: ARN guía.

SOB: (*Super Optimal Broth*) Medio de cultivo bacteriano súper óptimo.

SP: (Signal Peptide) Péptido señal.

TAE: Buffer Tris-Acetato-EDTA.

T-PBS: Tween 20 al 0.05% en PBS.

TS: Trans-sialidasas.



TSSA: (*<u>T</u>rypomastigote <u>Small Surface Antigen*) Antígeno pequeño de la superficie del tripomastigote.</u>

wt: (*Wild Type*) Tipo salvaje.



8.2. Anexo 2: Composición de soluciones y medios de cultivo

8.1.1 Soluciones:

Cracking Buffer **4X**: 200 mM Tris-HCl pH: 6,8, 8% SDS, 0,4% Bromophenol blue, 40% glicerol, 20% β-mercaptoetanol.

Annealing Buffer 10X: 10 mM Tris (pH 7,5 - 8 a 25 °C), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA.

P1: 25 mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA (pH 8), 50 mM glucosa

P2: 0,2 N NaOH, 1% (p/v) SDS

P3: 3 M acetato de potasio pH 4,8 o 3 M acetato de sodio pH 5,2

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na2HPO4; 2 mM KH2PO4, pH 7

Reaction Buffer **10X T4 DNA ligase**: 300 mM Tris-HCl (pH 7.8 a 25 °C), 100 mM DTT y 10 mM ATP.

Solución de Inoue (11t): 10,88 g MnCl2-4H2O, 2,2 g CaCl2, 18,65 g KCl, 10 ml PIPES (0,5 M pH 6,7), llevar a un litro con agua deionizada. Esterilizar por filtrado.

Solución de Rojo Ponceau: 0,1% (p/v) Rojo Ponceau, 5% (v/v) ácido acético.

Solución de siembra para muestras de ADN 6x (LB 6x): 0,25% (p/v) azul bromofenol, 0,25% (p/v) Xylen cyanol, 30 % glicerol

Solución de siembra para muestras de proteínas 5x (CB 5x): 50% (v/v) glicerol, 7,7% (p/v) **Solución de transferencia de proteínas:** Tris-base glicina pH 7 1X, 20% (v/v) metanol

TAE 50X (1lt): 242 g Tris Base, 57,7 ml de ácido acético glacial, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8, llevar a 1 litro con agua deionizada.

T-PBS: PBS, 0,05% (v/v) Tween 20

8.1.2. Medios de cultivo:

BHT: 33 g/l caldo cerebro-corazón, 3 g/l triptosa, 0,4 g/l KCl, 0,3 g/l glucosa, y 3,2 g/l Na2HPO4.

LB: Triptona de caseína 10 g, extracto de levadura 5 g y NaCl 5 g en 1 litro de agua. Se autoclava a 121 °C por 20 min.

LB-agar: se prepara LB y se adiciona agar 20 g/lt antes de autoclavar. Posteriormente se deja enfriar y se adicionan antibióticos (opcional). Se deja solidificar.



SOB: triptona de caseína 20 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 0,5 g, KCl 0,186 g en 950 ml de agua deionizada. Se ajusta el pH a 7 con una solución de NaOH 5 N. Se lleva a 1 litro con agua deionizada. Se autoclava a 12 °C por 20 min. Antes de su uso se adicionan 5 ml de una solución de MgCl2 2 M estéril.



9. Bibliografía:

- BALOUZ, V., 2020. Caracterización antigénica y funcional de la proteína TSSA (Trypomastigote Small Surface Antigen) de Trypanosoma cruzi. S.l.: s.n.
- BALOUZ, V., BRACCO, L., RICCI, A.D., ROMER, G., AGÜERO, F. y BUSCAGLIA,
 C.A., 2021. Serological Approaches for Trypanosoma cruzi Strain Typing. *Trends in Parasitology* [en línea], vol. 37, no. 3, pp. 214-225. ISSN 14715007. DOI
 10.1016/j.pt.2020.12.002. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.12.002.
- BALOUZ, V., CÁMARA, M. de los M., CÁNEPA, G.E., CARMONA, S.J., VOLCOVICH,
 R., GONZALEZ, N., ALTCHEH, J., AGÜERO, F. y BUSCAGLIA, C.A., 2015.
 Mapping antigenic motifs in the trypomastigote small surface antigen from Trypanosoma cruzi. Clinical and Vaccine Immunology, vol. 22, no. 3, pp. 304-312. ISSN 1556679X.
 DOI 10.1128/CVI.00684-14.
- BALOUZ, V., MESIAS, A.C., CAMEAN, C.C., DUCREY, I., LOBO, M.M., DURANTE,
 I.M., CÁNEPA, G.E., BUSCAGLIA, C.A. y CÁMARA, M. de los M., 2019.
 Homologous expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoproteins in
 trypanosoma cruzi. S.l.: s.n. ISBN 9781493991488.
- BERN, C., 2015. Chagas' Disease. New England Journal of Medicine, vol. 373, no. 5, pp. 456–466. DOI 10.1056/NEJMra1410150.
- BERNÁ, L., RODRIGUEZ, M., CHIRIBAO, M.L., PARODI-TALICE, A., PITA, S., RIJO, G., ALVAREZ-VALIN, F. y ROBELLO, C., 2018. Expanding an expanded genome: long-read sequencing of Trypanosoma cruzi. *Microbial genomics*, vol. 4, no. 5. ISSN 20575858. DOI 10.1099/mgen.0.000177.
- BHATTACHARYYA, T., BROOKS, J., YEO, M., CARRASCO, H.J., LEWIS, M.D.,
 LLEWELLYN, M.S. y MILES, M.A., 2010. Analysis of molecular diversity of the
 Trypanosoma cruzi trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes,
 evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *International Journal for Parasitology* [en línea], vol. 40, no. 8, pp. 921-928. ISSN
 00207519. DOI 10.1016/j.ijpara.2010.01.002. Disponible en:
 http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.002.
- BÖHME, U. y CROSS, G.A.M., 2002. Mutational analysis of the variant surface glycoprotein GPI-anchor signal sequence in Trypanosoma brucei. *Journal of Cell Science*, vol. 115,



no. 4, pp. 805-16. DOI 10.1242/jcs.115.4.805.

- BOUVIER, L.A., CÁMARA, M. de los M., CANEPA, G.E., MIRANDA, M.R. y PEREIRA, C.A., 2013. Plasmid Vectors and Molecular Building Blocks for the Development of Genetic Manipulation Tools for Trypanosoma cruzi. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, pp. e80217. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0080217.
- BRENER, Z., 1973. Biology of Trypanosoma cruzi. S.l.: s.n.
- BURLEIGH, B.A. y WOOLSEY, A.M., 2002. Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion. *Cellular Microbiology*, vol. 4, no. 11, pp. 701-711.
- BUSCAGLIA, C.A., CAMPO, V.A., FRASCH, A.C.C. y DI NOIA, J.M., 2006.
 Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature reviews Microbiology*, vol. 4, no. 3, pp. 229-236. ISSN 17401526. DOI 10.1038/nrmicro1351.
- CÁMARA, M. de los M., BALOUZ, V., CAMEÁN, C.C., CORI, C.R., KASHIWAGI, G.A., GIL, S.A., MACCHIAVERNA, N.P., CARDINAL, M.V., GUAIMAS, F., LOBO, M.M., DE LEDERKREMER, R.M., GALLO-RODRIGUEZ, C. y BUSCAGLIA, C.A., 2019. Trypanosoma cruzi surface mucins are involved in the attachment to the triatoma infestans rectal ampoule. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 13, no. 5. ISSN 19352735. DOI 10.1371/journal.pntd.0007418.
- CÁMARA, M. de los M., CÁNEPA, G.E., LANTOS, A.B., BALOUZ, V., YU, H., CHEN, X., CAMPETELLA, O., MUCCI, J. y BUSCAGLIA, C.A., 2017. The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) regulates Trypanosoma cruzi infectivity and differentiation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 11, no. 8, pp. e0005856. ISSN 19352735. DOI 10.1371/journal.pntd.0005856.
- CAMPETELLA, O., BUSCAGLIA, C.A., MUCCI, J. y LEGUIZAMÓN, M.S., 2020. Parasite-host glycan interactions during Trypanosoma cruzi infection: trans-Sialidase rides the show. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease* [en línea], vol. 1866, no. 5. ISSN 1879260X. DOI 10.1016/j.bbadis.2020.165692. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165692.
- CÁNEPA, G.E., DEGESE, M.S., BUDU, A., GARCIA, C.R.S. y BUSCAGLIA, C.A., 2012. Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells. *Biochemical Journal*, vol. 444, no. 2, pp. 211-218. ISSN 02646021. DOI 10.1042/BJ20120074.



- CEVEY, Á.C., MIRKIN, G.A., PENAS, F.N. y GOREN, N.B., 2016. Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent Trypanosoma cruzi strain. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, vol. 6, no. 1, pp. 12-22. ISSN 22113207. DOI 10.1016/j.ijpddr.2015.12.001.
- DE MARCHI, C.R., DI NOIA, J.M., FRASCH, A.C., AMATO NETO, V., ALMEIDA, I.C. y BUSCAGLIA, C.A., 2011. Evaluation of a recombinant Trypanosoma cruzi mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas' disease. *Clinical and vaccine immunology*, vol. 18, no. 11, pp. 1850-1855.
- DE PABLOS, L.M., GONZÁLEZ, G.G., PARADA, J.S., HIDALGO, V.S., LOZANO, I.M.D., SAMBLÁS, M.M.G., BUSTOS, T.C. y OSUNA, A., 2011. Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by Trypanosoma cruzi. *Infection and Immunity*, vol. 79, no. 10, pp. 3993-4001. ISSN 00199567. DOI 10.1128/IAI.05329-11.
- DE SOUZA, W., DE CARVALHO, T.M.U. y BARRIAS, E.S., 2010. Review on Trypanosoma cruzi: Host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*, vol. 2010. ISSN 16878876. DOI 10.1155/2010/295394.
- DI NOIA, J.M., BUSCAGLIA, C.A., DE MARCHI, C.R., ALMEIDA, I.C. y FRASCH, A.C.C., 2002. A Trypanosoma cruzi small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *Journal* of Experimental Medicine, vol. 195, no. 4, pp. 401-413. ISSN 00221007. DOI 10.1084/jem.20011433.
- DIAS, J.C., SILVEIRA, A.C. y SCHOFIELD, C.J., 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 97, no. 5, pp. 603-612. ISSN 00740276. DOI 10.1590/S0074-02762002000500002.
- GIORGI, M.E. y DE LEDERKREMER, R.M., 2020. The Glycan Structure of *T. cruzi* mucins Depends on the Host. Insights on the Chameleonic Galactose. *Molecules*, vol. 25, no. 17. ISSN 14203049. DOI 10.3390/molecules25173913.
- GIRONÈS, N., RODRÍGUEZ, C.I., BASSO, B., BELLON, J.M., RESINO, S., MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.A., GEA, S., MORETTI, E. y FRESNO, M., 2001. Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. *Clinical and*



Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 8, no. 6, pp. 1039-1043. ISSN 1071412X. DOI 10.1128/CDLI.8.6.1039-1043.2001.

- GONZALEZ CAPPA, S.M., BIJOVSKY, A.T., FREILIJ, H., MULLER, L. y KATZIN, A.M., 1981. Isolation of a Trypanosoma cruzi strain of predominantly slender form in Argentina. *Medicina*, vol. 41, no. 1, pp. 119-120.
- INOUE, H., NOJIMA, H. y OKAYAMA, H., 1990. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, vol. 96, no. 1, pp. 23-28. ISSN 03781119. DOI 10.1016/0378-1119(90)90336-P.
- LANDER, N., LI, Z.H., NIYOGI, S. y DOCAMPO, R., 2015. CRISPR/Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in Trypanosoma cruzi reveals their role in flagellar attachment. *mBio*, vol. 6, no. 4, pp. 1-12. ISSN 21507511. DOI 10.1128/mBio.01012-15.
- LIMA, L., ESPINOSA-ÁLVAREZ, O., ORTIZ, P.A., TREJO-VARÓN, J.A., CARRANZA, J.C., PINTO, C.M., SERRANO, M.G., BUCK, G.A., CAMARGO, E.P. y TEIXEIRA, M.M.G., 2015. Genetic diversity of Trypanosoma cruzi in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Tropica* [en línea], vol. 151, no. 1, pp. 166-177. ISSN 18736254. DOI 10.1016/j.actatropica.2015.07.015. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015.
- MUCCI, J., LANTOS, A.B., BUSCAGLIA, C.A., LEGUIZAMÓN, M.S. y CAMPETELLA, O., 2017. The Trypanosoma cruzi Surface, a Nanoscale Patchwork Quilt. *Trends in Parasitology* [en línea], vol. 33, no. 2, pp. 102-112. ISSN 14715007. DOI 10.1016/j.pt.2016.10.004. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.004.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2021. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Organización Mundial de la Salud* [en línea]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(americantrypanosomiasis).
- PENG, D., KURUP, S.P., YAO, P.Y., MINNING, T.A. y TARLETON, R.L., 2014. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in Trypanosoma cruzi. *mBio*, vol. 6, no. 1, pp. 1-11. ISSN 21507511. DOI 10.1128/mBio.02097-14.

PENG, D. y TARLETON, R., 2015. Eupagdt: A web tool tailored to design crispr guide rnas



for eukaryotic pathogens. *Microbial Genomics*, vol. 1, no. 4, pp. 1-7. ISSN 20575858. DOI 10.1099/MGEN.0.000033.

RASSI, A.J., RASSI, A. y MARCONDES DE REZENDE, J., 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* [en línea], vol. 26, no. 2, pp. 275-291. ISSN 08915520. DOI 10.1016/j.idc.2012.03.002. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22632639/.

SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M.,
PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B.,
TINEVEZ, J.Y., WHITE, D.J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P. y
CARDONA, A., 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676-682. ISSN 15487091. DOI 10.1038/nmeth.2019.

SCHMUNIS, G.A. y YADON, Z.E., 2010. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* [en línea], vol. 115, no. 1-2, pp. 14-21.
ISSN 0001706X. DOI 10.1016/j.actatropica.2009.11.003. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003.

- STANAWAY, J.D. y ROTH, G., 2015. The Burden of Chagas Disease: Estimates and Challenges. *Global Heart* [en línea], vol. 10, no. 3, pp. 139-144. ISSN 22118179. DOI 10.1016/j.gheart.2015.06.001. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.gheart.2015.06.001.
- TEIXEIRA, S.M., EL-SAYED, N.M. y ARAÚJO, P.R., 2011. The Genome and Its Implications. *Advances in Parasitology*, vol. 75, pp. 209-230. ISSN 0065308X. DOI 10.1016/B978-0-12-385863-4.00010-1.
- TEKIEL, V., OLIVEIRA, G.C., CORREA-OLIVEIRA, R., SÁNCHEZ, D. y GONZÁLEZ-CAPPA, S.M., 2005. Chagas' disease: TCRBV9 over-representation and sequence oligoclonality in the fine specificity of T lymphocytes in target tissues of damage. *Acta Tropica*, vol. 94, no. 1, pp. 15-24. ISSN 0001706X. DOI 10.1016/j.actatropica.2005.01.011.
- TYLER, K.M. y ENGMAN, D.M., 2001. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. *International Journal for Parasitology*, vol. 31, no. 5-6, pp. 472-481. ISSN 00207519. DOI 10.1016/S0020-7519(01)00153-9.

URBAN, I., BOIANI SANTURIO, L., CHIDICHIMO, A., YU, H., CHEN, X., MUCCI, J.,



AGÜERO, F. y BUSCAGLIA, C.A., 2011. Molecular diversity of the Trypanosoma cruzi TcSMUG family of mucin genes and proteins. *Biochemical Journal*, vol. 438, no. 2, pp. 303-313. ISSN 02646021. DOI 10.1042/BJ20110683.

- YAGOUBAT, A., CORRALES, R.M., BASTIEN, P., LÉVÊQUE, M.F. y STERKERS, Y.,
 2020. Gene Editing in Trypanosomatids: Tips and Tricks in the CRISPR-Cas9 Era. *Trends in Parasitology*, vol. 36, no. 9, pp. 745–760. DOI 10.1016/j.pt.2020.06.005.
- YOSHIDA, N., 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, vol. 78, no. 1, pp. 87-111.
- ZHANG, X.H., TEE, L.Y., WANG, X.G., HUANG, Q.S. y YANG, S.H., 2015. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, vol. 4, no. 11, pp. e264. ISSN 21622531. DOI 10.1038/mtna.2015.37.
- ZHENG, T., HOU, Y., ZHANG, P., ZHANG, Z., XU, Y., ZHANG, L., NIU, L., YANG, Yi, LIANG, D., YI, F., PENG, W., FENG, W., YANG, Ying, CHEN, J., ZHU, Y.Y., ZHANG, L.H. y DU, Q., 2017. Profiling single-guide RNA specificity reveals a mismatch sensitive core sequence. *Scientific Reports* [en línea], vol. 7, pp. 1-8. ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep40638. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/srep40638.
- ZINGALES, B., 2018. Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica* [en línea], vol. 184, pp. 38-52. ISSN 18736254. DOI 10.1016/j.actatropica.2017.09.017. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017.