

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

CARACTERIZACIÓN DEL ENTORNO MOLECULAR DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A CALCIO TcCAL1.

Carosella, Martin Ernesto – LU 1133007

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dra. Potenza, Mariana, INGEBI-CONICET

Co-Tutor:

Lic. Gallardo, Juan Pablo, INGEBI-CONICET

Octubre de 2025

UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Mariana Potenza, mi directora, por acompañarme con dedicación y orientarme en cada etapa de esta tesis. Su guía fue fundamental para aprender a trabajar con rigor y responsabilidad en investigación. También a Juan Pablo Gallardo, por su apoyo constante y por guiarme con paciencia en los momentos más desafiantes, aportando siempre claridad y compromiso al desarrollo de este trabajo.

A mi familia, que siempre estuvo a mi lado de manera incondicional. A mi papá, Alfredo, que me enseñó con su ejemplo el valor del esfuerzo diario y la perseverancia, mostrándome que el trabajo constante y honesto es la base para alcanzar cualquier meta. Su forma de enfrentar los desafíos me dio la fortaleza para nunca bajar los brazos. A mi mamá, que con su paciencia, amor y entrega me enseñó la importancia de la dedicación, el cuidado por los detalles y la disciplina, recordándome siempre que el camino se recorre paso a paso y con convicción. A toda mi familia, por su cariño inmenso. A mi abuela Esther, que con orgullo verá a su cuarto nieto recibirse de licenciado y que, con su cariño y ejemplo, me acompañó a lo largo de este camino. A la memoria de mis abuelos que ya no están, pero cuyo legado y enseñanzas siguen presentes en cada logro.

A mi amigo y hermano de corazón Francisco, y a mis amigos de siempre, por escuchar mis quejas, acompañarme en los días más difíciles y festejar cada logro conmigo, incluso cuando eso significó perderme momentos importantes juntos. A mis amigos de la facultad Bruno, Bauti, Joaco, Kevin y Pico, porque compartimos años únicos, llenos de desafíos, traspasadas de estudio y risas interminables. Más allá de las materias y los exámenes, me llevo amistades que sé que me van a acompañar toda la vida.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio Marti, Juani, Vicky, Noe, Jessi, Mica y, por supuesto, Juampi, por el compañerismo, los buenos momentos y todo lo que me enseñaron dentro y fuera de la ciencia. Gracias por estar siempre dispuestos a dar una mano y por hacer que cada día en el laboratorio fuera una oportunidad de aprender y crecer.

Y, por último, gracias a todas las personas que, de alguna forma, estuvieron presentes en este recorrido: a quienes me brindaron una palabra de aliento, compartieron una charla, una sonrisa o simplemente estuvieron cuando más lo necesitaba. Este logro no es solo mío, sino también de cada uno de ustedes, porque sin ese apoyo nada de esto hubiera sido posible.

Resumen

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas que afecta a millones de personas en América y el resto del mundo. Las opciones terapéuticas para tratar esta enfermedad, en especial en su etapa crónica son limitadas. Las vías de señalización dependientes de calcio (Ca^{2+}) son esenciales para la diferenciación e infectividad del parásito, aunque sus mecanismos aún no están completamente caracterizados. TcCAL1, una proteína de unión a Ca^{2+} identificada en nuestro laboratorio, demostró jugar un papel tanto en la metaciclologénesis como en la virulencia de *T. cruzi*. Para comprender cuál es la vía de acción de esta proteína, se realizó un ensayo de doble híbrido en levaduras que permitió identificar dos posibles proteínas asociadas a TcCAL1: una subunidad de la chaperona citosólica prefoldina (TcPFD) y una proteína con dominios armadillo (TcARM).

La presente tesis tuvo como objetivo general caracterizar el entorno molecular de TcCAL1 y validar la ocurrencia de las interacciones entre esta proteína y TcPFD o TcARM. Para esto se realizaron modelados estructurales de esas interacciones, ensayos de co-inmunoprecipitación acoplados a espectrometría de masas (coIP/MS) y la construcción de vectores recombinantes para establecer un sistema de biotinylación dependiente de proximidad (BioID). Como resultado, los modelos *in silico* mostraron que algunas modificaciones postraduccionales, como fosforilación o palmitoilación, podrían modular las interacciones de TcCAL1 con TcPFD o TcARM. También, la co-IP/MS reveló la presencia de estas proteínas a partir de resinas acopladas con un anticuerpo anti-TcCAL1, en línea con los hallazgos previos. Finalmente, se obtuvieron los cultivos transgénicos de expresión inducible de TcCAL1 fusionada a la ligasa de biotina BirA, para la futura implementación de la técnica de BioID en *T. cruzi*. que permitirá mapear el vecindario molecular de TcCAL1 en condiciones fisiológicas y/o identificar nuevas interacciones.

En conjunto, este trabajo aporta nuevos conocimientos sobre el entorno molecular de TcCAL1, un potencial regulador de la señalización dependiente de Ca^{2+} en *T. cruzi*, clave en procesos de diferenciación e infectividad de este patógeno.

Abstract

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, which affects millions of people across the Americas and worldwide. Therapeutic options for this disease, particularly in its chronic stage, remain limited. Calcium (Ca^{2+})-dependent signaling pathways are essential for parasite differentiation and infectivity, although their underlying mechanisms are not yet fully elucidated. TcCAL1, a Ca^{2+} -binding protein identified in our laboratory, has been shown to play a role in both metacyclogenesis and the virulence of *T. cruzi*. To elucidate the mode of action of this protein, a yeast two-hybrid assay was performed, which identified two potential TcCAL1-associated proteins: a subunit of the cytosolic chaperone prefoldin (TcPFD) and a protein containing armadillo domains (TcARM).

The overall aim of this thesis was to characterize the molecular environment of TcCAL1 and to validate its interactions with TcPFD and TcARM. To this end, structural modeling of these interactions was conducted, co-immunoprecipitation assays coupled to mass spectrometry (co-IP/MS) were performed, and recombinant vectors were constructed to establish a proximity-dependent biotinylation system (BioID). As a result, *in silico* models revealed that certain post-translational modifications, such as phosphorylation or palmitoylation, could modulate TcCAL1 interactions with TcPFD or TcARM. Furthermore, co-IP/MS detected these proteins in eluates from resins coupled to anti-TcCAL1 antibodies, consistent with previous findings. Finally, transgenic inducible cultures expressing TcCAL1 fused to the BirA biotin ligase were generated, providing the foundation for the future implementation of the BioID technique in *T. cruzi*. This approach will enable mapping of TcCAL1's molecular neighborhood under physiological conditions and/or the identification of novel protein interactions.

Taken together, this work provides new insights into the molecular environment of TcCAL1, a potential regulator of Ca^{2+} -dependent signaling in *T. cruzi*, and highlights its relevance in processes of differentiation and infectivity in this pathogen.

Contenidos

1. Introducción	7
1.1. Enfermedad de Chagas.	7
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.3. Algunos procesos regulados por calcio en el ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	12
2. Antecedentes.	15
3. Hipótesis.	19
3.1. Objetivos generales	19
3.2. Objetivos específicos.	19
4. Materiales y métodos.	20
4.1. Cultivos celulares.	20
4.1.1. Bacterias.	20
4.1.2. Parásitos.	21
4.1.3. Crio-preservación de clones.	21
4.1.4. Trasformación de bacterias y selección.	22
4.1.5. Transfección y selección de parásitos.	22
4.2. Técnicas de análisis de ácidos nucleicos.	23
4.2.1. Purificación de ácidos nucleicos.	23
4.2.2. Amplificación de ácidos nucleicos.	24
4.2.3. Reacciones de digestión y ligación de ácidos nucleicos	24
4.2.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.	25
4.2.5. Secuenciación de ácidos nucleicos.	25
4.3. Técnicas generales de análisis de proteínas.	26
4.3.1. Lisado de parásitos y obtención de extractos proteicos.	26
4.3.2. Cuantificación de proteínas.	26
4.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida.	27
4.3.4. Western Blot	28
4.3.5. Tinción con Coomassie.	28

4.3.6. Tinción con Ponceau	29
4.4. Ensayo de co – inmunoprecipitación	29
4.5. Análisis bioinformático.....	31
4.5.1. Obtención de modelos tridimensionales y análisis estructural.....	31
4.5.2. Análisis de redes funcionales.....	32
5. Resultados	33
5.1. Modelado estructural de TcCAL1 por aproximaciones <i>in silico</i>	33
5.2. Identificación de interacciones por co-inmunoprecipitación y espectrometría de masa.....	40
5.3. Construcción de un sistema de detección de interacciones <i>In vivo</i>	48
6. Discusión	56
7. Bibliografía.....	67
8. Anexo.....	78
8.1. Medios y soluciones	78
8.2. Anticuerpos.....	79
8.3. Oligonucleótidos y vectores.....	79
8.3.1. Oligonucleótidos.....	81

1. Introducción

1.1. Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas es causada por la infección con el parásito *Trypanosoma cruzi*. Es una zoonosis endémica en 21 países de América Latina, cuyo rango geográfico se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile (Winters et al., 2025). En las últimas décadas, los movimientos migratorios masivos de poblaciones latinoamericanas han favorecido la expansión de la enfermedad a regiones no endémicas, incluyendo Canadá, varios países de Europa, Japón y Australia, transformando lo que antes se consideraba un problema exclusivamente latinoamericano en un desafío de salud pública global. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre 6 y 7 millones de personas están infectadas actualmente por *T. cruzi*, y alrededor de 100 millones se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (Lidani et al., 2019). Esta cifra posiciona a la enfermedad de Chagas como una de las infecciones parasitarias más relevantes en términos de carga global, junto con malaria, dengue y leishmaniasis (De Fuentes-Vicente et al., 2023). La principal vía de transmisión del parásito en zonas endémicas es vectorial, sin embargo, la infección también puede ocurrir por vía congénita desde la madre infectada a su hijo recién nacido, por ingestión de alimentos contaminados con las formas infectivas del parásito, trasplante de órganos, transfusiones de sangre infectada con el parásito y en menor medida, por accidentes de laboratorio (Abrás et al., 2022; Sosa-Estani et al., 2015).

La infección cursa típicamente en dos fases: Fase aguda, se presenta de una a dos semanas después de la infección, suele ser asintomática o con síntomas inespecíficos —fiebre, malestar, adenopatías, hepatoesplenomegalia— y se caracteriza por una parasitemia elevada. Tras meses o años, la mayoría de los individuos entra en una fase indeterminada asintomática. Sin embargo, en un 20–30 % de los casos la infección evoluciona hacia formas sintomáticas crónicas, con afecciones cardíacas (miocardiopatía chagásica), digestivas (megacolon, megaesófago) o, con menor frecuencia, neurológicas (Passos et al., 2021).—Estas complicaciones se asocian con la persistencia de *T. cruzi* en tejidos, la inflamación crónica y

la autoinmunidad, que conducen a daño progresivo del miocardio, disfunción autonómica del tubo digestivo y alteraciones del sistema nervioso central.

El diagnóstico de la fase aguda se realiza mediante detección directa del parásito en sangre periférica, ya sea por microscopía de gota gruesa o microhematocrito, o por técnicas moleculares como PCR, que ofrecen alta sensibilidad y especificidad. En la fase crónica, donde la parasitemia es baja y fluctuante, la OMS recomienda el uso de al menos dos pruebas serológicas de distinta base antigénica y principio de detección, como ELISA, inmunofluorescencia indirecta o hemaglutinación indirecta, para confirmar la infección (Ossowski et al., 2024).

El tratamiento actual se basa en la administración de los compuestos Nifurtimox o Benznidazol. Dada su acción tripanocida, el tratamiento con estas drogas es efectivo si se administra en forma temprana luego de la infección con el parásito, es decir, en la etapa aguda de la enfermedad. En la fase crónica, la evidencia es más controvertida: aunque algunos estudios retrospectivos sugieren que el Benznidazol podría retardar o prevenir el compromiso cardíaco, una vez instauradas las lesiones irreversibles del miocardio o del tubo digestivo, la quimioterapia actual no revierte el daño. Ambos fármacos presentan además efectos adversos frecuentes (dermatitis, neuropatías, alteraciones digestivas) que ocasionan interrupción del tratamiento en un porcentaje no menor de pacientes (Abrás et al., 2022; De Fuentes-Vicente et al., 2023). Estas limitaciones justifican los esfuerzos internacionales para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a blancos moleculares del parásito, así como vacunas profilácticas o terapéuticas.

La enfermedad de Chagas representa un desafío integral de salud pública por su impacto sanitario, social y económico. Programas de control vectorial —fumigación con insecticidas de acción residual, mejora de viviendas rurales— han reducido drásticamente la incidencia en varios países, pero las reinfestaciones, la resistencia a insecticidas y la persistencia de reservorios silvestres dificultan la eliminación (De Fuentes-Vicente et al., 2023).

1.2. *Trypanosoma cruzi*.

T. cruzi es un protozoo que pertenece al filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae. En esta última se agrupan parásitos flagelados del género *Leishmania* y *Trypanosoma*, causantes de grandes problemas de salud en el humano. (Rassi et al., 2012; Teixeira et al., 2012).

El parásito *T. cruzi* divergió del resto de los eucariotas tempranamente en la evolución (Kaufer et al., 2019). Su ciclo de vida es complejo e involucra necesariamente el desarrollo alternado del parásito a través de un hospedador mamífero y un insecto vector. Durante este proceso *T. cruzi* coloniza diferentes entornos, tanto intra- como extracelulares, que le aseguran una exitosa proliferación y supervivencia. En la naturaleza, la forma epimastigote (E) del parásito se replica en el estómago del insecto vector infectado, migra al intestino posterior y allí se diferencia en tripomastigote metacíclico (TM). Estas formas infectivas son eliminadas junto con las heces del insecto y transmitidas al hospedador mamífero, donde inician la infección al ingresar a través de microlesiones cutáneas o de las mucosas. Una vez en contacto con la célula blanco, el parásito reconoce y se adhiere a receptores específicos de membrana, desencadenando una serie de eventos de señalización que incluyen la movilización de calcio tanto en el parásito como en la célula hospedadora (Caradonna y Burleigh, 2011). Posteriormente, *T. cruzi* induce la formación de una vacuola parasitófora transitoria que lo protege de los mecanismos microbicidas iniciales; a través de procesos dependientes de la maquinaria de endocitosis y de la interacción con el citoesqueleto, el parásito escapa de la vacuola hacia el citosol, donde se diferencia a amastigote intracelular (AI). En este estadio, se replica activamente hasta transformarse nuevamente en tripomastigotes sanguíneos, los cuales se liberan tras la lisis celular, permitiendo la diseminación de la infección a otros tejidos y su disponibilidad para ser ingeridos por nuevos vectores durante la hematofagia (Fig. 1).

Cada transición entre estas formas involucra procesos regulados y altamente coordinados, que comprenden interacciones específicas entre receptores de superficie del parásito y de la célula hospedadora, activación de cascadas de señalización intracelular y cambios profundos en la expresión génica (Caradonna y Burleigh, 2011). Además, el parásito ha desarrollado sofisticados mecanismos de evasión inmunitaria, entre los que destacan la variación

antigénica de glicoproteínas de superficie, la liberación de vesículas extracelulares y la modulación de citoquinas del hospedador, estrategias que le permiten persistir en los tejidos durante décadas y sostener la fase crónica de la enfermedad (Abrás et al., 2022; De Fuentes-Vicente et al., 2023).

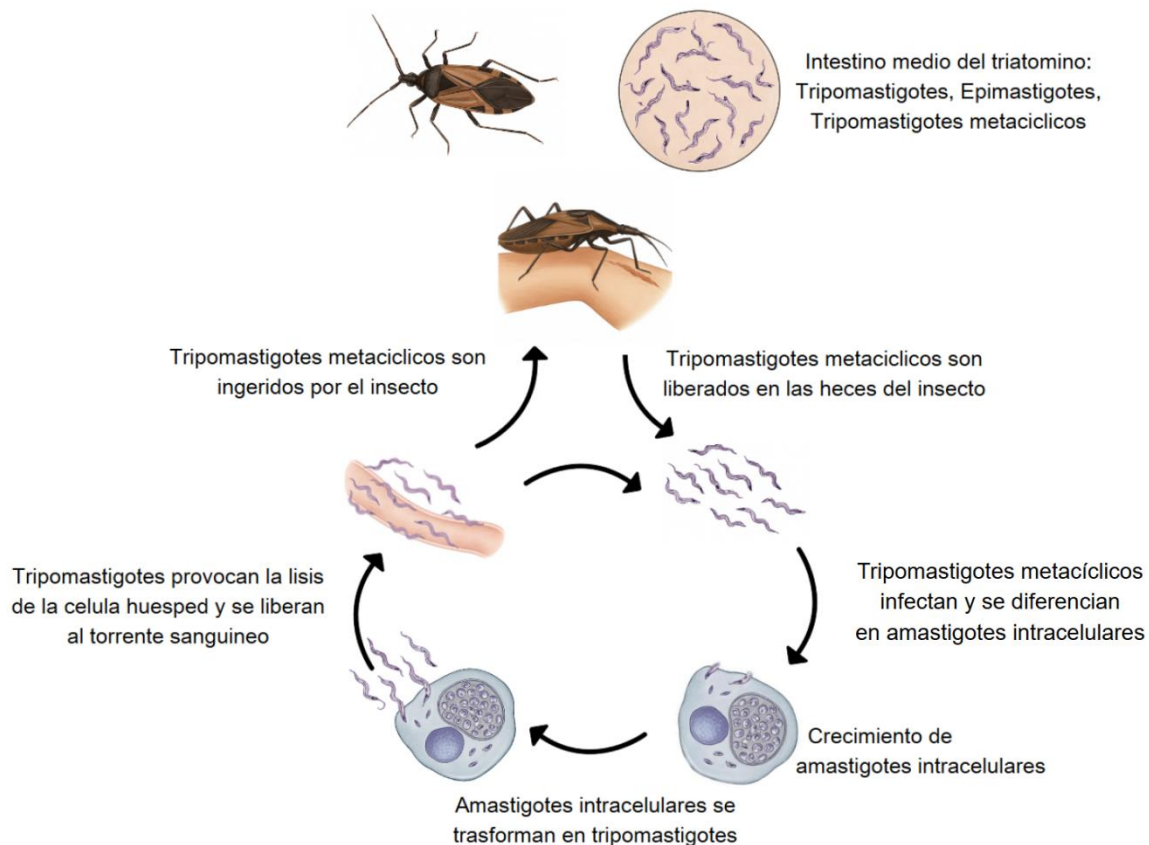


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. El ciclo comprende dos estadios en el insecto vector, epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y dos en el hospedador mamífero, amastigotes intracelulares y tripomastigotes sanguíneos (adaptada de: Medina-Rincón *et al.*, 2021).

T. cruzi junto con organismos relacionados del mismo género, poseen algunas características bioquímicas y estructurales particulares. En la superficie interna de su membrana plasmática, se disponen microtúbulos subpelliculares que, a diferencia de los de otros eucariotas, se hallan estrechamente asociados entre sí y anclados mediante filamentos cortos, formando un patrón helicoidal a lo largo del eje celular (Vidal y Souza, 2017). El flagelo, presente en todos los estadios del ciclo, varía en longitud desde 1 μm en amastigotes hasta unos 20 μm en las formas alargadas (Fig. 2). Su bolsillo flagelar —invaginación de la membrana en la región posterior de la célula— es un centro especializado de endocitosis y exocitosis, rico en proteínas y enzimas (Souza, 2002).

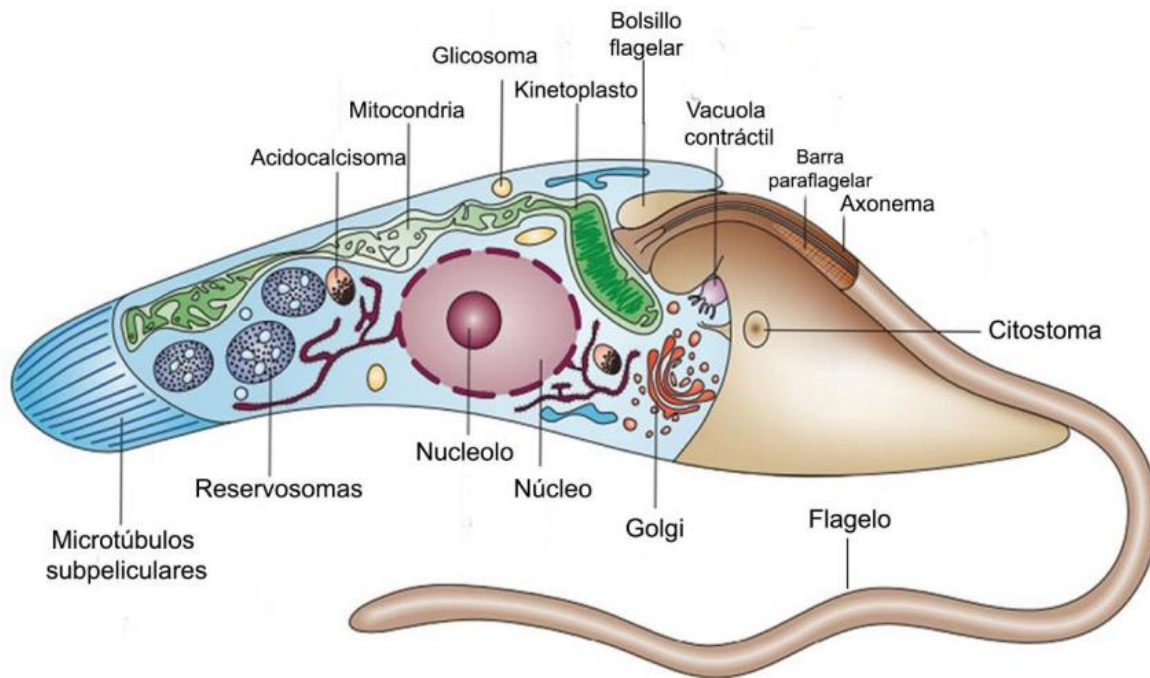


Figura 2. Representación esquemática de un epimastigote con un corte longitudinal. Se muestran las organelas internas. Tomado y modificado de (Docampo et al., 2005).

Una característica que distingue a *T. cruzi* y organismos relacionados con el resto de los eucariotas, es la existencia de una sola mitocondria elongada que contiene el kinetoplasto, una red de moléculas de ADN circular entrelazadas. Este ADN se organiza en maxicírculos (20–40 kb), que codifican genes mitocondriales convencionales, y minicírculos (0,5–10 kb), que se cuentan por miles y producen pequeños ARN guías para edición y modificaciones postraduccionales (Berná et al., 2021; Callejas-Hernández et al., 2021; Lukeš et al., 2002). El kinetoplasto se asocia con el cuerpo basal del flagelo, integrando funciones energéticas y de motilidad (Fig. 2).

Entre las organelas conservadas destaca el acidocalcisoma, reservorio de fosfatos complejados con cationes (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y Ca^{2+}). Estas estructuras, equipadas con bombas y transportadores, son esenciales en la regulación iónica y en la homeostasis del calcio (Docampo y Moreno, 2011). El retículo endoplásmico, íntimamente asociado a la membrana plasmática y a los microtúbulos subpeliculares, contribuye al almacenamiento de Ca^{2+} mediante la bomba Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA, alcanzando concentraciones similares a las del medio extracelular (~ 2 mM) (Benaim et al., 2020). Próximo al kinetoplasto y al bolsillo

flagelar se localiza el complejo de Golgi, cuyas cisternas varían de tamaño según el estadio, siendo mayores en epimastigotes (Souza, 2002).

Otras estructuras de importancia son el complejo citostoma-citofaringe y los reservosomas. El primero, presente en estadios replicativos, es una invaginación en forma de embudo que, junto con microtúbulos asociados, internaliza macromoléculas por endocitosis. Dichas vesículas son procesadas en los reservosomas, orgánulos esféricos de $\sim 0,7 \mu\text{m}$ ubicados en la región posterior que almacenan nutrientes y concentran cruzipaina, la principal cisteín-proteasa del parásito (Okuda et al., 1999; Vidal et al., 2016; Sant'Anna et al., 2004).

El control de la expresión génica difiere del modelo eucariótico clásico: los genes nucleares se transcriben como ARN policistrónicos, que luego se procesan a mensajeros maduros por *trans*-splicing. No se detectan promotores definidos para la ARN polimerasa II (Chávez et al., 2021a; Díaz-Viraqué et al., 2023). Además, *T. cruzi* posee una compartimentación metabólica particular: las primeras seis o siete enzimas de la glucólisis, de la β -oxidación y de la síntesis de fosfolípidos se concentran en los glicosomas, orgánulos similares a peroxisomas que permiten una regulación precisa de estas rutas (Hannaert et al., 2003; Michels y Gualdrón-López, 2022).

1.3. Algunos procesos regulados por calcio en el ciclo de vida de *T. cruzi*.

El ion calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero universal que participa en múltiples procesos celulares en eucariotas. En *T. cruzi*, las vías de señalización dependientes de Ca^{2+} son determinantes para su ciclo de vida, influyendo tanto en su diferenciación como en su capacidad de invadir células hospedadoras. Estudios clave han documentado la relevancia de este catión en dos contextos principales: la metaciclogénesis, que es la transición desde epimastigotes no infectivos a tripomastigotes metacíclicos infectivos, y la invasión de células de mamífero por las formas tripomastigotes, tanto metacíclicas como derivadas de células (Yoshida, 2006; Caradonna y Burleigh, 2011; Hashimoto et al., 2016).

Durante la metacicloogénesis se demostró la existencia de un incremento abrupto y transitorio en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) del parásito, independientemente de los niveles extracelulares de este ion (Lammel et al., 1996). Además del retículo endoplásmico, otros dos orgánulos han sido señalados como esenciales en este proceso en *T. cruzi*: los acidocalcisomas y el complejo de la vacuola contráctil (CVC). Ambos son estructuras ácidas que funcionan como depósitos de Ca^{2+} y participan en la regulación osmótica. El CVC, en particular, regula además el volumen celular al recolectar el exceso de fluidos citoplasmáticos y expulsarlos por exocitosis, proceso que depende de canales mecanosensibles permeables a Ca^{2+} y a osmolitos (Rohloff et al., 2004; Dave et al., 2021).

En el intestino del insecto vector, donde la osmolaridad es elevada (600–900 mOsm), estos canales se activan provocando la liberación de agua, aminoácidos y Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares. El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultante activa adenilato ciclasas (ACs), que producen AMPc y contribuyen a la señalización necesaria para la diferenciación a tripomastigotes metacíclicos (Rohloff et al., 2003; Docampo et al., 2013). También, se ha propuesto que el estrés osmótico fomenta la fusión de acidocalcisomas con el CVC, liberando aún más Ca^{2+} (Lander et al., 2021).

Aunque se identificó una adenilato ciclase sensible a Ca^{2+} en el flagelo de *T. cruzi* (D'Angelo et al., 2002), su mecanismo de activación sigue sin dilucidarse debido a la ausencia de dominios canónicos de unión a Ca^{2+} . Se sugiere que una proteína flagelar de unión a Ca^{2+} podría mediar esta activación (Hamedi et al., 2015). El flagelo, además de ser clave para la motilidad, interviene en la adhesión a las membranas del intestino del triatomino, un paso crítico para iniciar la metacicloogénesis (Schmidt et al., 1998).

La **invasión** celular de *T. cruzi* depende, entre otros factores, de un aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en el parásito tras su adhesión a la célula hospedadora. El proceso de interacción con el hospedador está mediado principalmente por glicoproteínas de superficie como gp82, gp30 y gp35/50, que al interactuar con receptores como LAMP-2 activan vías de señalización (PLC-IP₃, PKC, PI3K, mTOR) que inducen liberación de Ca^{2+} , exocitosis lisosomal y reorganización del citoesqueleto, facilitando la entrada del tripomastigote (Maeda et al., 2012; Onofre et al., 2021).

La **internalización** de *T. cruzi* en la célula hospedadora combina varias estrategias, y algunas de ellas dependen de Ca^{2+} . El reclutamiento de lisosomas en la célula hospedadora de mamífero, activado por el aumento transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico y la producción de AMPc, constituye un paso esencial para la formación de la vacuola parasitófora y la posterior liberación del parásito al citoplasma, donde se diferencia y establece su replicación (Maeda et al., 2012). A diferencia de otros patógenos que evitan los lisosomas, *T. cruzi* se beneficia del ambiente ácido de estos compartimentos, indispensable para su transición a amastigote.

A pesar del conocimiento antes mencionado, se desconoce la mayoría de los mecanismos y las moléculas involucradas en la generación y decodificación mediadas por Ca^{2+} en *T. cruzi*. Aún más, durante estos procesos, no solamente están involucradas proteínas canónicas, sino también proteínas noveles o también denominadas hipotéticas, sin homología de secuencia evidentes con otras proteínas de eucariotas, incluyendo a los mamíferos que *T. cruzi* parasita (Martins et al., 2011). En este contexto, el estudio de proteínas exclusivas de *T. cruzi* permite potencialmente avanzar en el conocimiento de los mecanismos de supervivencia como respuesta a distintos ambientes y en el establecimiento de la infección.

2. Antecedentes.

En nuestro laboratorio, estamos interesados en identificar y caracterizar posibles candidatos que estén involucrados en los mecanismos exclusivos de *T. cruzi* que decodifican las señales de Ca^{2+} intracelular y su homeostasis. A partir de una búsqueda bioinformática de la anotación del genoma de este parásito, empleando la base de datos TriTryp.db (<https://tritrypdb.org/>), se identificó una proteína exclusiva de tripanosomátidos, conteniendo dos dominios putativos de unión a Ca^{2+} del tipo EF-hand que se denominaron TcCAL1. El análisis de su secuencia aminoacídica permitió identificar con precisión los residuos que conforman ambos dominios EF-hand, así como también los que forman el bucle responsable de la coordinación del ion Ca^{2+} (Rodríguez Durán et. al, 2022). Esta proteína tiene 103 aminoácidos de longitud y, además, presenta un sitio de fosforilación en la serina 4, identificado en estudios de fosfoproteoma de *T. cruzi* (Santos Júnior et al., 2021). La historia evolutiva de TcCAL1 muestra que presenta ortólogos en todos los genomas del orden Trypanosomátida, pero está ausente en metazoos (Rodríguez Durán et. al, 2022).

En ensayos de microscopia, nuestro grupo observo que TcCAL1 se ubica intracelularmente, con un patrón de localización compatible al de proteínas citosólicas. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta en los estadios de amastigote, epimastigote y tripomastigote, se confirmó que la distribución de TcCAL1 es similar a la de otras proteínas con distribución intracelular conocidas, como la Ciclofilina 19 (Rodríguez Durán et al., 2024). Sin embargo, en ensayos de western blot (WB), también se detectó señal de TcCAL1 en la fracción insoluble. Este fraccionamiento celular evidenció la presencia de la proteína tanto en el sobrenadante como en el precipitado, sugiriendo que una fracción de la misma podría estar asociada a membranas. (Rodríguez Durán et al., 2024).] Dicha asociación puede darse como resultado de la palmitoilación de alguno o ambos residuos de cisteína en su región C-terminal. Con relación a esto, se evaluó experimentalmente la posible adición de ácido palmítico a TcCAL1, empleando la técnica de intercambio de grupos acilos por biotina o ABE, que permite identificar proteínas palmitoiladas (Wan et al., 2007). Esta metodología consiste en el bloqueo de las cisteínas no modificadas, seguido de la ruptura específica de los enlaces tioéster de palmitato mediante hidroxilamina (HA), lo que permite sustituir el lípido por una etiqueta de

biotina detectable por Western Blot. Los resultados de estos ensayos permitieron observar una banda nítida en el peso molecular correspondiente a TcCAL1 en las muestras tratadas con HA, señal que estuvo ausente en el control de especificidad. Esto apoya la hipótesis que TcCAL1 se encuentra efectivamente palmitoilada (Rodríguez Durán et al., 2024), lo que resulta en una asociación a membranas.

Para estudiar la posible función de esta proteína en el ciclo de vida de *T. cruzi*, se generaron en nuestro laboratorio cultivos de epimastigotes transgénicos que sobreexpresan constitutivamente TcCAL1 fusionada a una etiqueta de seis histidinas (TcCAL1x6His). En ensayos *in vitro*, la sobreexpresión de TcCAL1x6His resultó en una marcada inhibición de la metaciclogénesis, cuando se compara la tasa de diferenciación entre estos cultivos y los controles, transfectados con el plásmido de expresión vacío (Rodríguez Durán et al., 2022). Estos resultados sugieren que la disponibilidad de Ca^{2+} en el citoplasma, necesaria para la diferenciación, puede estar comprometida por el secuestro de este ion por parte de altos niveles de TcCAL1x6His. Este efecto inhibitorio se observó en distintas cepas y, además, resultó ser dosis dependiente: a mayor expresión de TcCAL1x6His, menor tasa de metaciclogénesis (Rodríguez Durán et al., 2022).

Para poner a prueba esta hipótesis, en nuestro laboratorio se realizaron mediciones comparativas de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1x6His y los controles, utilizando el indicador radiométrico Fura 2AM y un espectrofluorímetro multiplaca robotizado. Estos experimentos mostraron que, cuando los cultivos se someten a concentraciones moderadas de digitonina, que rompe selectivamente la membrana plasmática dejando intacta la membrana mitocondrial (Vercesi et al., 1991), el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es significativamente mayor en los parásitos controles con respecto a los que sobreexpresan TcCAL1x6His. En las determinaciones radiométricas, se observó que los cultivos controles (transfectados con el vector vacío) presentan una señal de calcio libre significativamente mayor, en comparación con los epimastigotes que sobreexpresan TcCAL1 (Rodríguez Durán., 2024). Este comportamiento sugiere una capacidad de buffer más eficiente del flujo de iones que ingresa al citoplasma en los parásitos transgénicos con respecto a los controles.

La asociación de Ca^{2+} por TcCAL1 también fue estudiada por métodos fluorimétricos utilizando la proteína recombinante TcCAL1x6His producida en bacterias, y el indicador fluorescente Quin-2, que permite monitorear la unión a este ion por las proteínas sembradas en spots de membranas de PVDF (Lakowicz et al., 1992). En estos ensayos, TcCAL1x6His mostró una señal de fluorescencia dependiente de la concentración de calcio, similar a la obtenida con proteínas de unión a calcio de referencia (Rodríguez Durán et al., 2024), en concordancia con los resultados obtenidos empleando epimastigotes sobre-expresantes de TcCAL1.

Por otro lado, y llamativamente, los ensayos de invasión celular *in vitro* mostraron que la sobreexpresión de TcCAL1x6His en tripomastigotes metacíclicos favorece tanto la adhesión como la internalización de los parásitos a células Vero (Rodríguez Durán et al., 2022). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de TcCAL1x6His podría conferir una ventaja en la capacidad de invasión, posicionando esta proteína como un posible factor de virulencia.

En este contexto, en nuestro grupo de investigación se propuso identificar cuáles son las moléculas que interaccionan con TcCAL1, con el objetivo de asociar a esta proteína en una ruta metabólica específica. Para esto, iniciamos distintos abordajes. En primer lugar, se realizó un ensayo de doble híbrido en levaduras (2HL) para identificar los posibles componentes que se asocian a TcCAL1x6His, expresando esta proteína como carnada conjuntamente con una biblioteca de cDNA de *T. cruzi* (Gómez et al., 2001). Como resultado, se identificaron dos proteínas hipotéticas de *T. cruzi* que interaccionan con TcCAL1 en este sistema (Ferrer et al. 2017). Una de estas asociaciones corresponde a una proteína con función putativa de chaperonas citosólicas denominada prefoldina (TcPFD) (Liang et al., 2020). La otra asociación corresponde a un fragmento C-terminal de 300 aminoácidos de una proteína sin función putativa asignada que denominamos TcARM300, con localización compatible con el aparato de Golgi y/o vacuola contráctil. La secuencia completa que incluye al fragmento C-terminal TcARM300 y que denominamos TcARM, tiene 1076 aminoácidos y contiene cinco dominios del tipo armadillo a lo largo de secuencia. Estos motivos son secuencias repetitivas de 40 aminoácidos de longitud que se asocian para formar estructuras alfa-hélice superpuesta y están especializados en mediar interacciones proteína-proteína (Hatzfeld, 1998).

En este escenario, nos proponemos avanzar con los estudios que permitan indagar sobre la ocurrencia de estas interacciones en un contexto fisiológico.

3. Hipótesis.

La hipótesis de este trabajo plantea que las interacciones proteína–proteína identificadas mediante el ensayo de doble híbrido entre TcCAL1 y dos posibles ligandos, una subunidad de prefoldina (TcPFD) y una proteína con dominio tipo armadillo (TcARM), ocurren efectivamente en el contexto intracelular de *Trypanosoma cruzi* y están moduladas tanto por la señalización dependiente de Ca^{2+} como por modificaciones postraduccionales (MPT). En este marco, dichas interacciones podrían desempeñar un rol en procesos clave del ciclo de vida del parásito, como la metaciclogénesis y la invasión de células de mamífero, constituyendo potenciales nodos reguladores de la virulencia.

3.1. Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo es describir el entorno molecular de TcCAL1, una proteína con dominios de unión a calcio (Ca^{2+}) de *T. cruzi*, patógeno unicelular responsable de causar la Enfermedad de Chagas. Para esto se propone validar la interacción entre TcCAL1 con dos proteínas (previamente identificadas en un ensayo de doble híbrido), así como también identificar nuevos componentes de asociación.

3.2. Objetivos específicos.

Para alcanzar el objetivo general, se propone realizar las siguientes tareas específicas:

- a. Realizar experimentos de co-inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-TcCAL1, seguido de espectrometría de masa, para identificar las moléculas que pudieran formar complejos con esta proteína, a partir de un extracto de células de *T. cruzi* en cultivo.
- b. Diseñar y construir los vectores recombinantes que posibiliten la aplicación de la técnica de biotilación dependiente de proximidad en *T. cruzi*, con el fin de utilizar otro abordaje para identificar interactores de TcCAL1
- c. Emplear métodos bioinformáticos para la caracterización *in silico* de la estructura de TcCAL1 con sus interactores, obtenidos por ensayo de doble híbrido como los identificados por espectrometría de masa.

4. Materiales y métodos.

4.1. Cultivos celulares.

4.1.1. Bacterias.

***E. coli* DH5 α** - Genotipo: F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF), U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -1 gyrA96 relA1 λ).

Condiciones de crecimiento en medio líquido: A partir de una colonia individual previamente seleccionada en placa con ampicilina, se inoculó un matraz Erlenmeyer o tubo cónico estéril conteniendo medio LB líquido suplementado con ampicilina a 100 μ g/mL. El volumen de medio se ajustó de modo que el recipiente quedara con al menos un tercio de espacio libre para permitir la adecuada aireación.

El cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante (180–220 rpm) durante 12–16 horas (*overnight*), hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6–1,0 a 600 nm (fase estacionaria temprana). Este cultivo se destinó inmediatamente a la extracción de ADN plasmídico, criopreservación en glicerol (25% final) o preparación de alícuotas para experimentos posteriores.

Condiciones de crecimiento en medio sólido y selección clonal: se realizó en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con ampicilina 100 μ g/mL. Para la siembra, se retiró una alícuota de células competentes transformadas o de un cultivo stock y se sembró mediante el movimiento de esferas de vidrio en la superficie de la placa, distribuyendo de forma homogénea el inóculo. Las placas se incubaron *overnight* a 37 °C en posición invertida. Las colonias individuales resultantes se utilizaron para la preparación de cultivos líquidos.

Preparación de placas de Petri: Se prepararon placas de Petri con medio LB-agar suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL. La ampicilina se añadió al medio enfriado a para preservar su actividad, mezclando suavemente antes de verter

en las placas. Una vez solidificado el agar, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y de ser necesario, se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

En todos los casos, se trabajó en condiciones estériles bajo mechero Bunsen para evitar contaminaciones, y se descartaron los residuos líquidos y sólidos siguiendo las normas de bioseguridad y tratamiento de desechos biológicos.

4.1.2. Parásitos.

Los Tripanosomas en las formas epimastigotes (cepa Dm28c) se cultivaron a 28 °C en medio LIT o BHT suplementado con 10% (v/v) de SFB y antibiótico de selección geneticina (G418) (Invivogen, USA) a una concentración final de 500 µg/mL.

El repique periódico de cultivos de *T. cruzi* se realizó para mantener los parásitos en fase logarítmica y evitar la acumulación de productos metabólicos tóxicos. Los cultivos se monitorearon diariamente por microscopía óptica. Al alcanzar la densidad deseada ($\approx 1-2 \times 10^9$ parásitos/mL), se tomó un volumen adecuado y se transfirió a un matraz con medio fresco de LIT o BHT suplementado con suero fetal bovino, ajustando la densidad inicial a $1-2 \times 10^8$ parásitos/mL. Los repiques se efectuaron en condiciones estériles dentro de una cabina de bioseguridad.

El conteo de epimastigotes de *T. cruzi* se realizó utilizando una cámara de Neubauer, permitiendo estimar la densidad celular para ajustar inóculos y repiques. Se homogenizó el cultivo para dispersar agregados celulares y se tomó una alícuota de 10 µL, que se depositó en la cámara de Neubauer bajo cubreobjetos. El recuento se realizó en cuatro cuadrantes grandes y el promedio se multiplicó por el factor correspondiente para obtener la concentración en parásitos/mL (factor = número promedio $\times 10^4$).

4.1.3. Crio-preservación de clones.

La criopreservación se utilizó para el almacenamiento a largo plazo de clones bacterianos y de *T. cruzi*, asegurando la viabilidad y estabilidad genética de los cultivos.

Para bacterias, los cultivos se crecieron en medio líquido apropiado con agitación hasta alcanzar fase logarítmica. Se mezcló el cultivo con glicerol estéril, obteniendo una concentración final de glicerol del 25 % (v/v). La mezcla se homogenizó suavemente, se transfirió a crioviales estériles y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para su recuperación, se tomó una alícuota estéril directamente del vial y se sembró en medio sólido selectivo, preservando el resto del contenido para uso posterior.

En el caso de *T. cruzi*, se tomó 1 mL de cultivo en fase logarítmica, se centrifugó brevemente para concentrar los parásitos y se resuspendió en DMSO 10% (v/v) en SFB, para luego almacenarlo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para su recuperación, el criovial se descongeló rápidamente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, el contenido se transfirió a un tubo con medio fresco a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se centrifugó suavemente para eliminar el glicerol. El pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo, se incubó a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h y posteriormente se añadió el marcador de selección, continuando la incubación hasta alcanzar la densidad celular requerida.

4.1.4. Transformación de bacterias y selección.

Bacterias *E. coli* (DH5 alfa) electrocompetentes fueron transformadas por electroporación en MicroPulser (Bio-Rad, Estados Unidos) en cubetas de 0.2 cm con 50 - 100 ng de ADN plasmídico, empleando un protocolo estándar (Di Renzo et al., 2016). Las transformantes se sembraron en placas de petri con LB-agar Ampicilina, las colonias seleccionadas obtenidas fueron estriadas en nuevas placas y analizadas por minipreparación de ADN plasmídico seguida de digestión con enzimas de restricción. Luego los clones seleccionados se criopreservaron.

4.1.5. Transfección y selección de parásitos.

Las transfecciones de epimastigotes se realizaron en la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) mediante un protocolo estándar de electroporación, utilizando los plásmidos pTcINDEX-BirA-TcCAL1 y pTcINDEX-BirA-GFP. Epimastigotes en fase logarítmica fueron recolectados, lavados y resuspendidos en tampón Tb-BSF conteniendo 10 μg de ADN

linealizado, y sometidos a un pulso en un equipo Amaxa Nucleofector 2B con el programa U-033 (Nittolo et al., 2025).

Tras la electroporación, las células se incubaron durante 24 h en medio de cultivo fresco para permitir la recuperación. Posteriormente se inició la selección positiva añadiendo 300 µg/mL de higromicina B.

4.2. Técnicas de análisis de ácidos nucleicos.

4.2.1. Purificación de ácidos nucleicos.

La purificación de ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina siguiendo el siguiente proceso:

Se obtuvieron precipitados a partir de 5-10 mL de cultivos bacterianos crecidos en LB líquido con ampicilina como marcador de selección. El precipitado se resuspendió en 200 µL de buffer P1. Luego, para lisar las células se agregaron 200 µL de buffer P2, y se mezcló suavemente por inversión. Para precipitar el DNA genómico y proteínas, se agregaron 200 µL de buffer P3 y se mezcló suavemente por inversión. Para separar el DNA genómico del plasmídico, se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 min a 14.000 xg. Se recolectó el sobrenadante conteniendo el DNA plasmídico, y se precipitó mediante el agregado de 1 volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión e incubó a -20°C, al menos 30 min. Se centrifugó a 12.000 xg a 4°C por 30 min, se descartó el sobrenadante y en caso de requerir una mejor pureza de DNA plasmídico, se lavó el precipitado con 1 mL de 70 % (v/v) etanol frío. Se centrifugó a 12.000 xg a 4°C por 15 min, se descartó el sobrenadante y se incubó brevemente a 37°C para evaporar el solvente residual. Por último, el precipitado se resuspendió en agua milliQ estéril suplementada con 1mg/mL de RNasa.

Las purificaciones de fragmentos de DNA obtenidos por restricciones o reacciones de PCR, se realizaron empleando un ensayo comercial Clean Up utilizando el ensayo comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Estados Unidos), según requerimientos de masa y condiciones indicadas por el fabricante.

Los vectores se purificaron con los ensayos comerciales Plus SV Minipreps DNA purification system o Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System, según requerimientos de masa (ambos de Promega, Estados Unidos), según condiciones indicadas por el fabricante.

4.2.2. Amplificación de ácidos nucleicos.

Se utilizaron enzimas polimerasas Q5, TaqPol (New England Biolabs, Estados Unidos), para la amplificación de secuencias con alta fidelidad. El volumen final de las reacciones fueron de 20 o 25 μ L tal que: H₂O miliQ; Buffer (específico de la enzima); 10 ng ADN molde plasmídico; dNTP's 10mM; Primer Forward 10 μ M; Primer Reverse 10 μ M; Enzima polimerasa 2000 U/mL.

Los programas de ciclado de PCR se definieron considerando la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos, que depende del contenido de GC y permite fijar con precisión desnaturalización, alineamiento y extensión. También se evaluó la longitud del amplicón, expresada en pares de bases, para ajustar los tiempos de elongación y la eficiencia de amplificación. Finalmente, se incorporaron la procesividad y velocidad de síntesis de cada ADN polimerasa, adecuando las temperaturas y la duración de los ciclos a las propiedades de la enzima para garantizar una amplificación precisa y reproducible.

4.2.3. Reacciones de digestión y ligación de ácidos nucleicos

Los vectores o fragmentos de DNA fueron procesados mediante reacciones de restricción según el diseño de cada clonado. Se utilizó 1 U (unidad) de enzima de restricción (NEB, Estados Unidos; o ThermoScientific, Estados Unidos) por cada 1 μ g de DNA. La solución se incubó en el buffer compatible siguiendo las recomendaciones del fabricante durante 30 min a 1 h a 37°C y en caso de permitirlo se inactivo a 65°C por 15 min.

Las reacciones de ligación se realizaron con la enzima T4 DNA ligasa (Promega, Estados Unidos), utilizando condiciones adecuadas para la unión de fragmentos de ADN con extremos romos o cohesivos (30 minutos a temperatura ambiente y hasta 16 horas a 4 °C). Este procedimiento se aplicó tanto para la generación del plásmido pTIDEX-BirA-TcCAL1,

mediante la inserción del fragmento codificante de TcCAL1 en el vector pLew100_myc-BirA previamente linealizado, como para la construcción del plásmido pTINDEx-GFP-BirA, empleando la misma estrategia de ligación. Una vez completadas las reacciones, las mezclas de ligación se transformaron en células de *E. coli* electrocompetentes para su amplificación y posterior análisis.

4.2.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Las cuantificaciones de ADN se llevaron a cabo por electroforesis en gel de agarosa y tinción por Bromuro de etidio, o por técnicas espectrofotométricas utilizando un equipo Nanodrop (DeNovix, Estados Unidos). Por otro lado, los oligonucleótidos se cuantificaron por espectrometría de absorción a 260 nm empleando espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido).

Se prepararon geles de agarosa en concentraciones entre 0,8% y 2% p/v, dependiendo del tamaño esperado de los fragmentos de ADN, disolviendo la agarosa en buffer TAE 1X mediante calentamiento en microondas hasta la completa disolución. La solución caliente se enfrió y se adicionó bromuro de etidio (0,5 µg/mL) o un colorante alternativo seguro. La mezcla se vertió en la bandeja de moldeo con peine y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Las muestras se mezclaron con buffer de carga (6X) (Loading Dye Purple, NEB) y se depositaron en los pocillos junto con un marcador de peso molecular (DNA ladder). La corrida se realizó en cuba horizontal con tampón TAE 1X a un voltaje de 80–100 V, hasta que el frente de corrida alcanzó aproximadamente dos tercios del gel. Los geles se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador (SynGene) y las imágenes se documentaron digitalmente.

4.2.5. Secuenciación de ácidos nucleicos.

Las secuenciaciones se realizaron por el método de Secuenciación por Electroforesis Capilar (CES) brindado por la empresa Macrogen Inc. (<https://dna.macrogen.com/eng/>, Korea), empleando oligonucleótidos propios, diseñados en este trabajo. La identidad de las secuencias

obtenidas se analizó mediante el programa Benchling (<https://www.benchling.com/molecular-biology>, 2024).

4.3. Técnicas generales de análisis de proteínas.

4.3.1. Lisado de parásitos y obtención de extractos proteicos.

Cosecha de epimastigotes de *T. cruzi*: A partir de un cultivo de parásitos de 40 mL, se calculó la concentración de células por cámara de Neuaber; el medio fue centrifugado a 3.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, y el precipitado de células se lavó 3 veces con PBS 1X frío, finalmente se pesó y almacenó a -80°C hasta su uso.

Obtención de extractos proteicos: El precipitado se resuspendió en buffer de lisis con inhibidor de proteasas, en relación 1:10 peso en volumen (mg/mL). Se incubó en hielo durante 8 minutos mezclando cada un minuto. La lisis se completó con tres ciclos de congelado/descongelado alternando en nitrógeno líquido y en agua a temperatura ambiente (10 segundos cada uno). Se centrifugó a 13.000 x g durante 20 minutos para eliminar los restos celulares insolubles, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, almacenándose a -20°C.

4.3.2. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas totales fue realizada utilizando el método colorimétrico de Bradford (Kruger, 2002), que se basa en la interacción del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 con las proteínas, produciendo un cambio en la absorbancia medible a 595 nm.

Se confeccionó una Curva Estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA): se preparó un stock principal de BSA (10 mg/mL), del cual se realizó un stock intermedio de 4 mg/mL, y a partir de esta última solución se realizaron 10 diluciones de concentraciones 0.7, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.00 mg /mL.

Las mediciones de la curva y las muestras se realizaron por cuadruplicado, disponiendo 10 μL de cada dilución previamente mezclada y 200 μL de reactivo de Bradford, en una placa 96 pocillos; utilizando distintas diluciones de cada muestra por cuadruplicado.

La cuantificación de proteínas también se realizó por medición de absorbancia a 280 nm, empleando el equipo Nanodrop (DeNovix, Estados Unidos). En el caso de proteínas obtenidas en los eluidos finales de co-inmunoprecipitación se utilizó como blanco el buffer de elución.

4.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se utilizó para separar las proteínas en función de su peso molecular.

Armado de geles de poliacrilamida: Los geles se prepararon utilizando el sistema de electroforesis vertical Mini-PROTEAN[®]. Cada gel estuvo compuesto por una capa de separación y una capa de stacking. El gel de separación al 15% se preparó con 1.44 mL de H₂O Milli-Q, 1 mL de glicerol, 2.5 mL de Tris (pH 8.8), 4.9 mL de acrilamida, 100 μL de SDS al 10%, 50 μL de APS y 6 μL de TEMED. Esta mezcla se vertió entre las placas de vidrio hasta aproximadamente dos tercios de la altura total del gel. Una vez polimerizado, se añadió el gel de stacking, preparado con 3.7 mL de H₂O Milli-Q, 1.25 mL de Tris (pH 6.8), 0.57 mL de acrilamida, 50 μL de SDS al 10%, 25 μL de APS y 5 μL de TEMED, hasta completar el espacio restante, colocando inmediatamente el peine para formar los pocillos.

Preparación de muestras y siembra: Se tomaron 5 μL de muestras o eluidos a analizar los cuales fueron desnaturalizados por calor a 95°C por 5 min en un volumen igual de *sample buffer* 2x con β -mercaptoetanol (5 μL muestra + 5 μL Sample Buffer).

Electroforesis SDS-PAGE: El cassette con el gel se montó en la cámara interna del sistema Mini-PROTEAN[®] y se rellenó la misma con *Running Buffer* hasta la marca de geles. La corrida electroforética se realizó inicialmente a 90 V durante la migración a través del gel de stacking y posteriormente a 130 V durante la separación en el gel de resolución, hasta que el frente de corrida alcanzó el extremo inferior del gel.

4.3.4. Western Blot

La técnica de western blot se empleó para la detección específica de proteínas mediante el reconocimiento de epítomos por anticuerpos, y posterior detección de la señal por quimioluminiscencia.

Transferencia: Una vez finalizada la electroforesis se colocó el gel de separación sobre una membrana de nitrocelulosa y se taparon con papeles de filtro embebidos en buffer de transferencia, al igual que las placas de contacto (2.5 mL Tris-Glicina; 5 mL metanol; s.c.p. 25 mL H₂O mQ). La transferencia se realizó a 85 mA por 40 min con un límite de voltaje máximo de 30v.

Inmunodetección: Al finalizar transferencia, la membrana se bloqueó con una solución de leche descremada 5% en PBS durante 60 minutos; luego se lavó y se incubó con una solución de anticuerpo primario anti-TcCAL1 en una dilución 1:400 (Anticuerpo primario; leche descremada 2% en PBS 1x), a 4°C por 16 h en agitación. Luego se realizaron 4 lavados con PBS; se incubó en una solución de anticuerpo secundario anti-IgG en una dilución 1:6000 (anticuerpo secundario; leche descremada 2% en PBS tween20 1x) de ratón a temperatura ambiente por 60 minutos en *shaker* 250 rpm, luego se realizaron 4 lavados con PBS tween 20. El revelado se realizó en un equipo marca GeneGnome, con un ensayo comercial de bioluminiscencia (Thermo Scientific™ Pierce ECL Western Blotting Substrate). El revelado se realizó incubando la membrana con la solución del ensayo y se tomaron fotos a distintos tiempos para evaluar la intensidad de señal.

4.3.5. Tinción con Coomassie.

La detección de proteínas totales presentes en las muestras inmunoprecipitadas se llevó a cabo mediante tinción con azul brillante de Coomassie G-250, luego de resolverlas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida., Este fue incubado por 20 minutos en una solución colorante compuesta por 0,1% Coomassie G-250, 50% metanol y 10% ácido acético glacial, asegurando la inmersión completa del gel y agitación suave para favorecer la penetración del

colorante. Finalizado ese tiempo, se procedió a una decoloración progresiva mediante sucesivos lavados con una solución de 40% metanol y 10% ácido acético hasta obtener bandas de contraste definido. Esta técnica permitió verificar la integridad y el perfil proteico general de las fracciones purificadas obtenidas por co-IP antes de su envío a análisis de espectrometría de masas.

4.3.6. Tinción con Ponceau.

La tinción con Ponceau S se empleó para la detección reversible de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa tras transferencia desde geles SDS-PAGE. La membrana se incubó durante 5 minutos con una solución al 0,1% en ácido acético al 5%, seguida de lavados sucesivos con agua destilada hasta eliminar el colorante de fondo. Este procedimiento permitió visualizar bandas proteicas para confirmar una transferencia homogénea antes de proceder con el bloqueo e incubación con anticuerpos. Una vez verificada la transferencia, la tinción fue removida completamente mediante lavado con buffer PBS, lo que permitió continuar con los pasos de bloqueo e inmunodetección.

4.4. Ensayo de co – inmunoprecipitación.

En este estudio, empleamos la técnica de co-inmunoprecipitación para identificar las proteínas que interactúan con TcCAL1, empleando el ensayo comercial Pierce® Crosslink Immunoprecipitation Kit (Thermo Scientific, Estados Unidos):

Acople del anticuerpo a resina de proteína A/G-agarosa: Se tomaron 30 μ L de la resina de proteína A-agarosa previamente homogeneizada, a una mini-columna, y se centrifugó, descartando el exceso de líquido. La resina se lavó dos veces con 250 μ L de Coupling buffer (CB) 1X. y se centrifugó, descartando el sobrenadante. En cada columna, se agregaron 5 μ L de 20X CB, 55 μ L de agua Mili Q y 40 μ L del anticuerpo. El anticuerpo se añadió directamente sobre la resina. Se cerró la columna herméticamente con parafilm; luego se incubó en un rotador a temperatura ambiente durante 60 minutos, asegurando que la resina permaneciera suspendida durante la incubación. Después de la incubación, se centrifugó la

columna y se guardó el percolado para verificar el acople de anticuerpo. Se realizó en paralelo tanto el acople de anticuerpo anti-TcCAL1, como también del suero pre-inmune.

Crosslinking del anticuerpo unido a la resina: Una vez que el anticuerpo está acoplado, se utiliza el reactivo suberato de disuccinimidilo (DSS) para formar enlaces covalentes entre el anticuerpo y la resina. Esto evita que el anticuerpo se disocie durante las fases de elución posteriores en la inmunoprecipitación.

Se preparó una solución de DSS 25 mM disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). Luego, se diluyó esta solución 1:10 en DMSO para obtener una concentración final de 2.5 mM. La reacción de crosslinking se llevó a cabo añadiendo rápidamente 2.5 μ L de 20X CB, 15 μ L de DSS 2.5 mM y 37.5 μ L de agua Mili Q a la columna y agitando inmediatamente. La columna se cerró con el tapón y tapa correspondientes, se selló herméticamente con Parafilm y se colocó en un rotador a temperatura ambiente durante 60 minutos para asegurar un crosslinking eficiente del anticuerpo a la resina. Después de la incubación se agregaron 50 μ L de Elution Buffer (EB) para detener completamente el crosslinkado y eliminar anticuerpos no unidos covalentemente a la resina, este *flow-through* fue guardado para comprobar el éxito del crosslinking. La resina se lavó dos veces con 200 μ L de Lysis/Wash Buffer (LWB) y resuspendió con un mismo volumen de este buffer, y se almacenó a -4°C .

Pre-clearing del lisado: Para evitar uniones inespecíficas, se incubaron 1.5 mg del extracto proteico por 1 h a 4°C con agitación suave en columnas con resina control de agarosa. Se centrifugó y el percolado pre-clarificado se guardó para la inmunoprecipitación.

Inmunoprecipitación: La columna se lavó dos veces con 200 μ L de LWB, posteriormente se secó la abertura inferior de la columna y se cerró con su tapa correspondiente. Se añadió el lisado celular pre-clarificado a la columna con la resina crosslinkada (resina-anticuerpo) y se incubó en un mezclador *overnight* a 4°C . Tras la incubación, se realizó una centrifugación reservando el percolado de la columna. Luego se realizaron 3 lavados con LWB para eliminar las proteínas no específicas que no se unieron al anticuerpo y un lavado final con *Conditioning* buffer, las proteínas unidas se eluyeron 2 veces con 50 μ L *Elution* buffer.

4.5. Análisis bioinformático.

4.5.1. Obtención de modelos tridimensionales y análisis estructural.

La predicción de la estructura tridimensional de las proteínas se realizó empleando AlphaFold3 (<https://alphafoldserver.com/>) (Jumper et al., 2021; Mirdita et al., 2022) en su formato de servidor, utilizando como entrada las secuencias de aminoácidos obtenidas de la base de datos TriTrypDB (Aslett et al., 2010). Para cada predicción se usaron los parámetros por defecto, obteniéndose modelos con valores de confianza pLDDT superiores a 70, indicativos de alta fiabilidad en las regiones helicoidales. Se generaron modelos de la proteína TcCAL1 en su estado nativo y variantes con modificaciones postraduccionales específicas, incluyendo: palmitoilación y fosforilación, con el objetivo de evaluar el impacto estructural de estas modificaciones. La palmitoilación se modeló mediante la adición de ácido palmítico en cisteínas, mientras que la fosforilación se simuló incorporando un grupo fosfato en la serina en posición 4.

Los sitios candidatos de unión a Ca^{2+} se predijeron utilizando los servidores COACH y COFACTOR (<https://yanglab.nankai.edu.cn/COACH-D/>) (Zhang et al., 2017), que integran información de homología, geometría y energías de interacción para localizar cavidades de coordinación de iones divalentes. Las predicciones de COACH/COFACTOR se mapearon sobre los modelos tridimensionales obtenidos en AlphaFold3 para examinar la proximidad de residuos cargados negativamente y grupos polares compatibles con la coordinación de Ca^{2+} .

Para explorar las posibles interacciones de TcCAL1 con TcPFD y TcARM,, se construyeron modelos de estas proteínas a partir de sus secuencias de TriTrypDB, prediciendo su estructura en AlphaFold3. En el caso de TcPFD, se generó un complejo homohexamérico (TcPFD \times 6) y se ensayó su interacción con TcCAL1 en las variantes nativa, palmitoilada o fosforilada.

La comparación entre los modelos nativos y modificados se realizó en PyMOL (Schrödinger et al., 2020), analizando la orientación de las hélices N- y C-terminales y la estabilidad del núcleo helicoidal central. Estas superposiciones permitieron determinar desplazamientos

locales y cambios en la accesibilidad de regiones hidrofóbicas relevantes para la interacción con membranas o complejos proteicos.

Para identificar y visualizar la posición de diferentes dominios en las proteínas de estudio, se empleó la plataforma online Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/>).

4.5.2. Análisis de redes funcionales.

Para investigar conexiones biológicas adicionales, se utilizó la plataforma STRING (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2022) con el fin de buscar interacciones conocidas entre TcCAL1 y las proteínas identificadas en ensayos de doble híbrido de levadura (TcPFD y TcARM) u otros posibles interactores.

5. Resultados

5.1. Modelado estructural de TcCAL1 por aproximaciones *in silico*.

Con el fin de caracterizar de manera estructural las posibles interacciones de TcCAL1 con las proteínas TcPFD y TcARM, se diseñó un estudio computacional detallado que complemente la evidencia experimental e incluya el impacto de modificaciones postraduccionales (MPT) en estas asociaciones. En esta sección se describen los resultados obtenidos a partir del análisis bioinformático, cuyo objetivo fue predecir y evaluar la estabilidad conformacional de TcCAL1, identificar sitios de unión a Ca^{2+} , y explorar el impacto de la palmitoilación y/o fosforilación sobre su estructura y sus interacciones.

En primer lugar, mediante el empleo de AlphaFold3, se obtuvieron modelos tridimensionales de TcCAL1 con valores de confianza altos ($\text{pLDDT} > 70$) (Fig. 3, Panel A) en la mayoría de las regiones helicoidales. La búsqueda de sitios candidatos de unión a Ca^{2+} se realizó con la herramienta COACH, lo que permitió localizar potenciales cavidades con afinidad por este catión. En dichas regiones se analizaron los cambios conformacionales inducidos por la coordinación de Ca^{2+} . Para una inspección visual más precisa, se empleó PyMOL, que permitió superponer distintos estados conformacionales y resaltar variaciones estructurales en los extremos N- y C-terminales de la proteína (Fig. 3, Panel B y C). Las posiciones de los iones predichos se indican como esferas verdes, localizadas estratégicamente en las cercanías de segmentos helicoidales compatibles con motivos EF-hand. Este patrón de localización concuerda con la geometría característica de coordinación de iones divalentes, ampliamente descrita en proteínas homólogas conteniendo estos motivos en diversos organismos eucariotas. El posicionamiento de los iones en relación con residuos cargados negativamente y grupos polares sugiere que estas cavidades no son producto de artefactos de predicción, sino regiones estructuralmente viables para la coordinación de Ca^{2+} . De hecho, esta disposición recuerda a lo descrito en calmodulina y troponina C, proteínas clásicas con EF-hand, en las cuales la unión del calcio ocurre dentro de cavidades bien delimitadas por residuos ácidos y genera cambios conformacionales relevantes para su función reguladora. (Rodríguez Durán, 2024).

Esto sugiere que la proteína posee un núcleo estable compatible con la función de sensor/decodificador de Ca^{2+} .

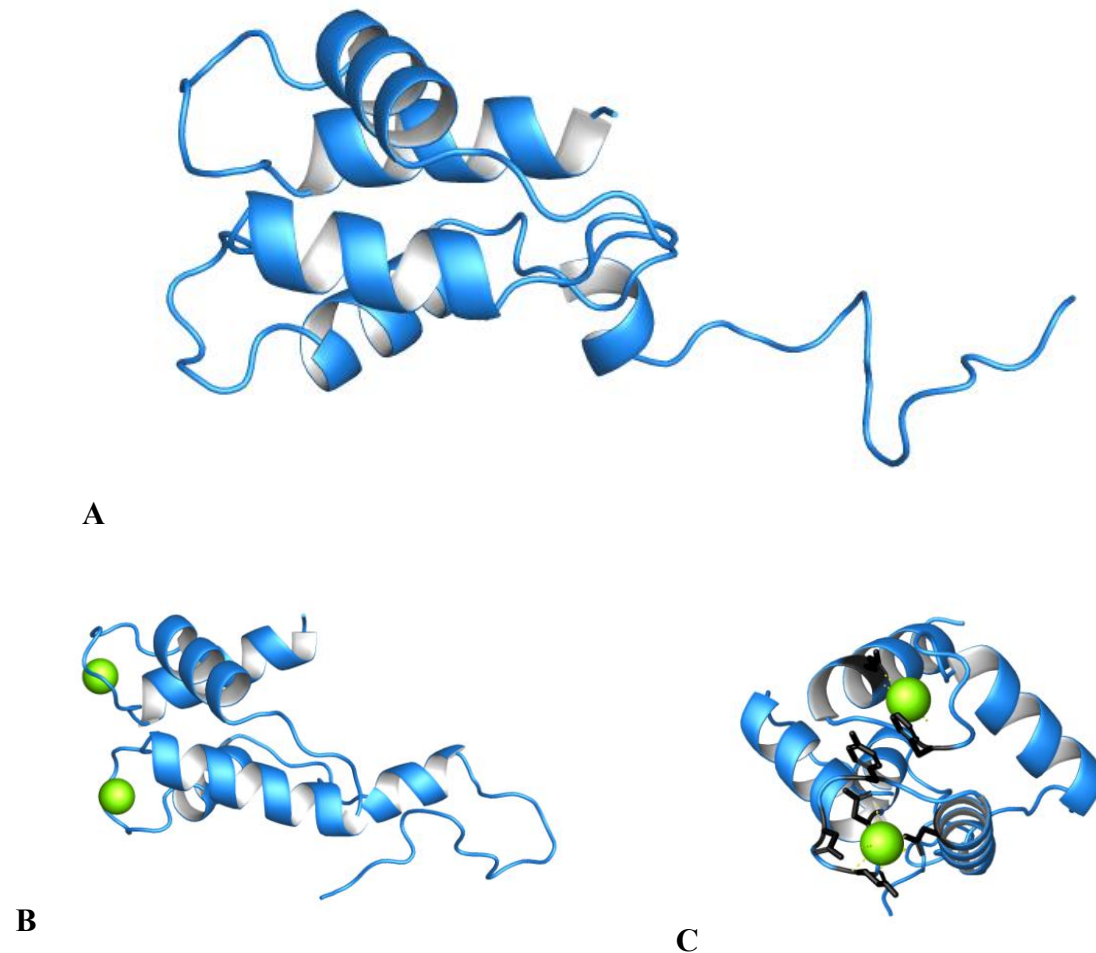


Figura 3: Modelados estructurales de TcCAL1 (A): se observa la estructura base de TcCAL1, conformada por un núcleo helicoidal compacto y una región desordenada en su extremo N- terminal. **(B):** se muestra la estructura de TcCAL1 predicha en la herramienta COACH mostrando los dos iones Ca^{2+} en las cavidades candidatas. **(C):** se presenta una vista en orientación distinta que permite apreciar la disposición espacial de las cadenas laterales (negro) que participan en la coordinación de Ca^{2+} .

Con el fin de evaluar la plasticidad de TcCAL1 frente a modificaciones postraduccionales (MPT), se generaron variantes estructurales en la plataforma AlphaFold3, en las que se introdujeron modificaciones reportadas experimentalmente o potencialmente relevantes.

Las cisteínas localizadas en las posiciones 94 y 95 se encuentran en una región del polipéptido potencialmente accesible. Su palmitoilación se modeló mediante la incorporación de dos moléculas de ácido palmítico, cada una unida a las cisteínas expuestas en la proteína. La superposición de la proteína con y sin adición de palmítico mostró un desplazamiento parcial en la última hélice C-terminal (respecto a la estructura de TcCAL1 sin esta MPT) y en una hélice adyacente con respecto a la estructura en ausencia de esta MPT, lo que sugiere que esta modificación podría facilitar la interacción con superficies hidrofóbicas, como membranas o dominios proteicos expuestos. (Fig. 4, Panel A).

Por otro lado, el modelado de TcCAL1 luego de la incorporación de un grupo fosfato en la serina 4 produjo un reacondicionamiento en el extremo N-terminal, evidenciado en la orientación distinta de la hélice inicial respecto al modelo sin PTMs. Este cambio sugiere que la fosforilación podría modular interacciones electrostáticas de TcCAL1 con proteínas cargadas positivamente o con regiones específicas de sus posibles ligandos proteicos. (Fig. 4, Panel B)

En conjunto, el análisis de las cuatro estructuras de TcCAL1 (ausencia de PTM, presencia de iones Ca^{2+} , palmitoilación o fosforilación), reveló que el núcleo helicoidal central se conserva, mientras que el extremo N-terminal exhibe mayor flexibilidad y sensibilidad a las modificaciones. (Fig 3 y 4).

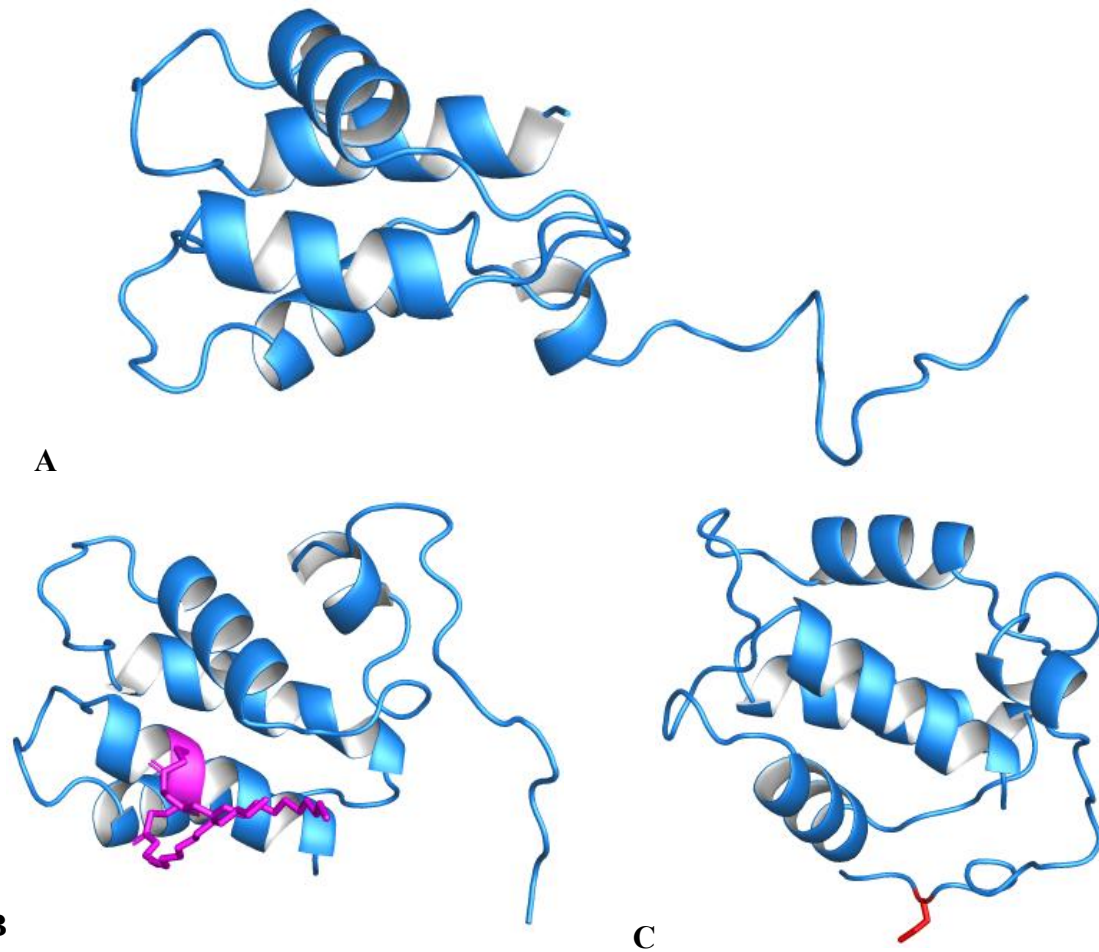


Figura 4: Predicciones estructurales de TcCAL1 con distintas MPT. (A): se observa la estructura tridimensional de TcCAL1, sin MPT. (B): modelo estructural con cisteínas C94 y C95 palmioiladas (magenta). (C): modelo con fosforilación en la serina 4 (S4) (rojo).

Posteriormente, se analizó la estructura predicha de la interacción de TcCAL1 con **TcPFD**, una chaperona molecular que suele formar una estructura hexamérica. Para esto, en primer lugar se modeló un complejo homomérico formado por seis copias de TcPFD (TcPFD×6) mediante AlphaFold3 (Fig 10 A y E). Luego, se incorporó a este complejo la estructura de TcCAL1 con y sin MPT.

En ausencia de MPT, se observó que TcCAL1 interacciona con el complejo de TcPFD×6, posicionándose en el hueco formado por el hexámero, sin alterar de manera significativa la geometría del multímero (Fig. 5, Panel B y F). Sin embargo, la palmitoilación en C94 y C95 introduce un cambio notable: TcCAL1 adopta una conformación extendida y el hexámero de PFD se muestra más abierto en comparación a la interacción en ausencia de MPT (Fig. 5,

Panel C y G). En cambio, observamos que la fosforilación en la serina 4 produce un efecto distinto (Fig. 5, Panel D y H). Aquí, el extremo N-terminal fosforilado de TcCAL1 se aproxima a una de las subunidades de PFD, favoreciendo un posible anclaje electrostático entre el grupo fosfato cargado negativamente y residuos cargados positivamente del hexámero, de manera distinta a TcCAL1 sin PTM.

Las vistas superiores de estas estructuras permiten mostrar con mayor claridad cómo TcCAL1 se dispone en relación al canal central de PFD y cómo las MPT inducen reorganizaciones espaciales diferenciales (Fig. 5, Paneles E–H). Mientras que TcCAL1 en ausencia de MPT mantiene la simetría general del hexámero, la palmitoilación lo flexibiliza y la fosforilación concentra el contacto en puntos específicos de interacción.

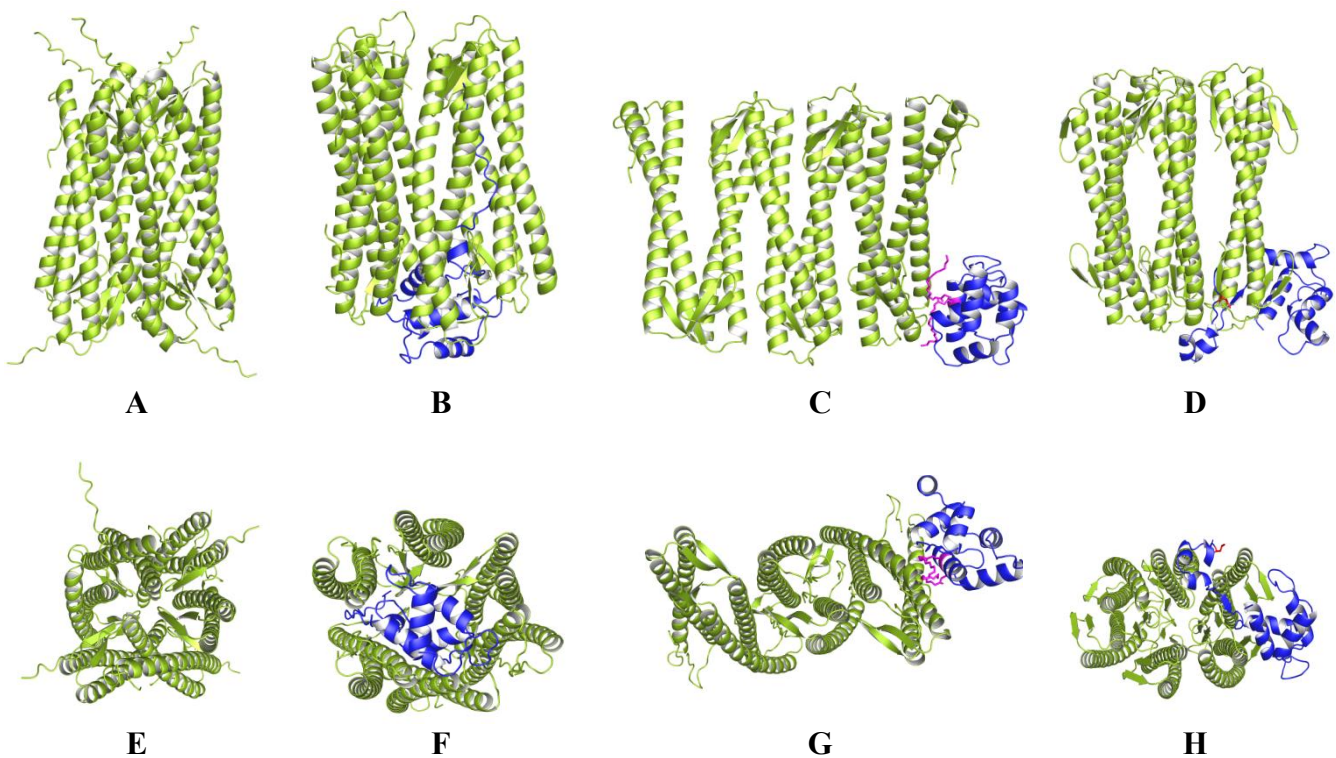


Figura 5: Modelado estructural del complejo TcPFD×6 y TcCAL1 (indicados en color verde y en azul, respectivamente) en presencia o ausencia de distintas PTM . **(A):** Estructura hexamérica de PFD en ausencia de TcCAL1. **(B):** Complejo de TcPFD×6y TcCAL1 en ausencia de PTM. **(C):** estructura de TcPFD×6c en presencia de la variante palmitoilada de TcCAL1 (magenta). **(D):** complejo formado por TcPFD×6y la variante fosforilada de TcCAL1 (PTM_F_S4). **Paneles E–H:** Se muestran vistas superiores de cada uno de los modelos (A–D) para facilitar la comparación espacial. Todas las simulaciones fueron modeladas en ausencia de Ca²⁺.

En relación a los modelados de estos complejos entre TcPFD×6 y TcCAL1 en presencia de Ca^{2+} , observamos que el programa AlphaFold asociaba algunos iones a los monómeros de PFD y no directamente a los dominios EF-hand de TcCAL1, imposibilitando realizar una interpretación correcta de la predicción estructural.

Por otro lado, se realizó también el modelado estructural de TcARM. Esta proteína presenta múltiples repeticiones tipo armadillo y ricas en leucinas, según el programa Interpro, que identifica también, un péptido transmembrana en la posición 849 (Fig. 6A). Además, se observa en el extremo N-terminal, una región extensa de carácter no citosólico, y en el extremo C-terminal, la proteína presenta una región orientada hacia el citosol. El modelo obtenido permitió definir con claridad su arquitectura general, y como su estructura repetitiva genera una cavidad interna y posibles superficies de interacción (Fig. 6B). También, se evaluó la interacción de TcARM con TcCAL1, observándose que esta proteína se ubica de manera estable en el centro de la estructura dentro del hueco central generado por su organización repetitiva (Fig. 6C). En los modelos realizados incluyendo las MPT, ya sea por palmitoilación o fosforilación, TcCAL1 ajustó su conformación para acercar dichas regiones modificadas hacia superficies compatibles de TcARM, mientras que la arquitectura global de TcARM se mantuvo sin cambios significativos. (Fig. 6B).

Es importante señalar que se representa exclusivamente la interacción entre TcARM y TcCAL1 sin MPT (Fig. 6C). Si bien en las simulaciones adicionales se evaluó el efecto de la fosforilación y palmitoilación sobre TcCAL1, dichos modelos no se incluyen en la figura debido a que no presentan cambios significativos en la arquitectura global de TcARM. En estos casos, TcCAL1 ajustó localmente su conformación para, manteniéndose la interacción estable previamente observada.

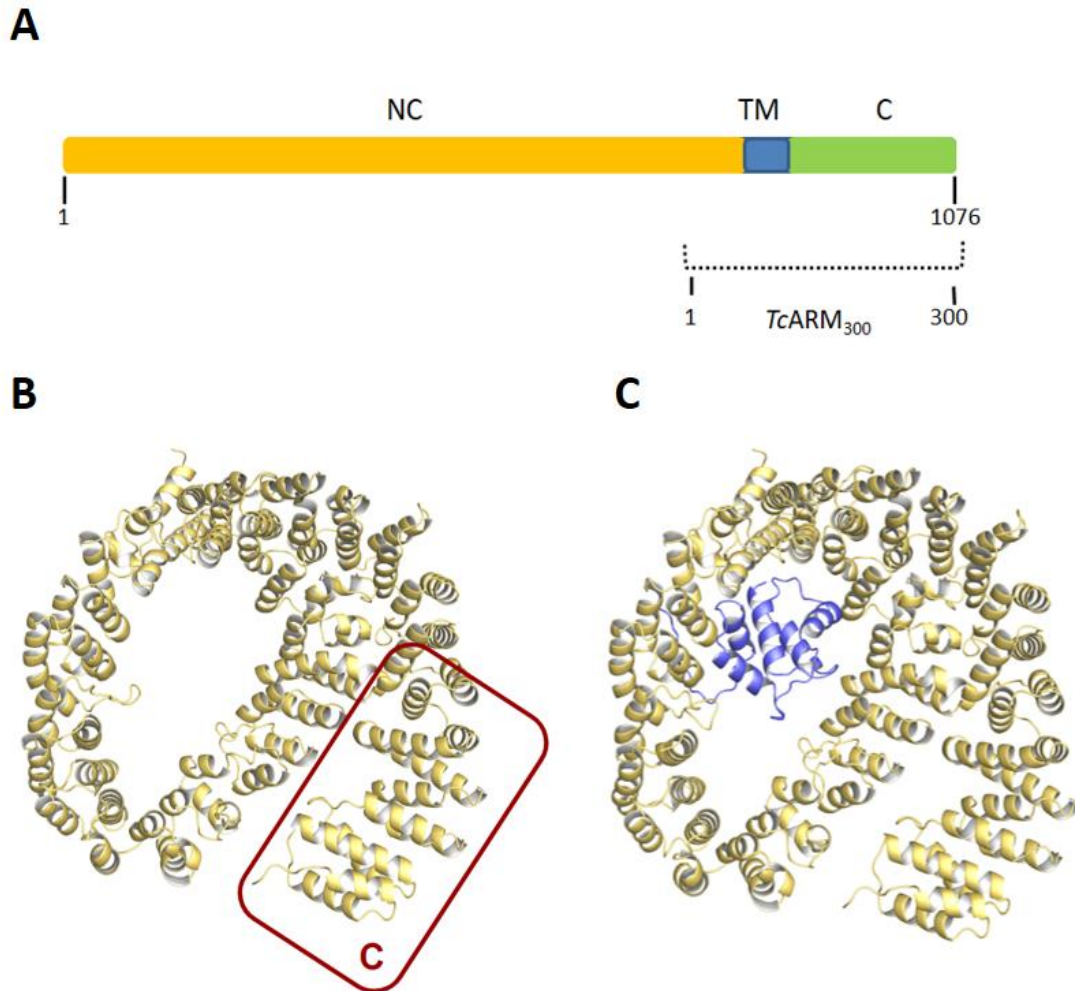


Figura 6: Dominios y modelado estructural de TcARM. (A): Representación de algunas características de la proteína TcARM. Se indican las regiones no citosólica (NC, naranja), transmembrana (TM, azul), y citosólica (C, verde) predichas *in silico* para los 1076 aminoácidos de TcARM. El extremo C-terminal TcARM300 contiene la región TM y se indica con un corchete punteado (B): Estructura de la proteína, mostrando su plegamiento característico. Se recuadra la región citoplasmica de TcARM (indicada en el recuadro rojo “C”). C: modelo de TcARM en asociación con TcCAL1 (indicada en color azul).

5.2. Identificación de interacciones por co-inmunoprecipitación y espectrometría de masa.

Con el fin de identificar proteínas que interactúan con TcCAL1, se realizó una co-inmunoprecipitación (co-IP) utilizando resinas de proteína A-agarosa acopladas con el suero anti-TcCAL1 y extractos proteicos de *T. cruzi*, con posterior identificación por espectrometría de masas. Como control, se realizó en paralelo una resina conteniendo un suero pre-inmune acoplado covalentemente, cuyos eluidos se compararon con los del antisuero para detectar interacciones específicas.

En una primera etapa se acoplaron covalentemente con el *crosslinker* DSS el antisuero anti-TcCAL1 (C-TcCAL1) o el suero pre-inmune (C-PreI) por separado, a resinas de proteína A-agarosa, ambas estabilizadas mediante acoplamiento covalente (cross-link) con la correcta inmovilización de los anticuerpos en cada resina y la eliminación del material no unido se verificó mediante WB, analizando las fracciones obtenidas en cada etapa del procedimiento (Fig. 16).

En la generación de C-TcCAL1, se observó que, si bien se empleó un exceso de anticuerpo para acoplar a la resina, el acople covalente resultó exitoso (Fig. 16). Luego, la resina C-TcCAL1 se incubó con 1 miligramo de extracto total clarificado de *T. cruzi* y se procedió a realizar la co-IP según se especificó en la sección materiales y métodos (p. 34). Como resultado, en el análisis por WB del eluido de la columna se detectó una señal a la altura esperada para TcCAL1 (Fig. 16A). En cambio, en los eluidos de C-PreI se observó una ausencia de esta señal específica (Fig. 16B).

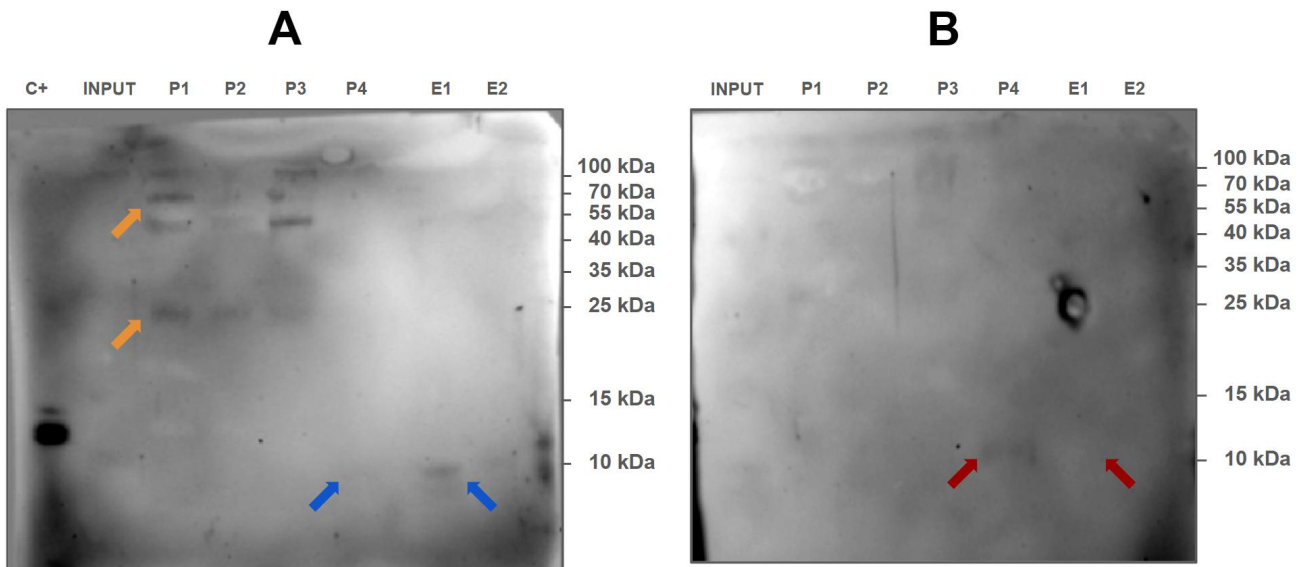


Figura 16: Análisis por western blot de la Co-IP utilizando resinas acopladas con suero anti-TcCAL1 (A) o pre-inmune (B). En ambos paneles se muestran los distintos pasos del procedimiento: C+, control positivo de TcCAL1 recombinante. INPUT, extracto de *T. cruzi* antes de inocular con la resina. P1, percolado del acople del anticuerpo a la resina. P2, lavados post-acople. P3, lavado posterior al acople covalente (Crosslink). P4, percolado de la incubación del extracto proteico de *T. cruzi* con la resina. E1 y E2: eluciones. Las flechas azules indican, en el caso de A, la presencia de una señal a la altura esperada de TcCAL1 en la elución 1, y la ausencia de esta en el percolado P4, cuando se utiliza la resina C-TcCAL1. Por el contrario, se observa la presencia de esta banda en el percolado P4 y su ausencia en E1 cuando se emplea el control de C-PreI (indicado con flechas rojas). A la derecha de cada WB se indican los valores del marcador de peso molecular. Notar la presencia de anticuerpo en los percolados P1 a P3 (indicado con flechas naranjas), producto de una saturación de la resina del panel A.

Posteriormente, los eluidos obtenidos de las dos columnas (C-TcCAL1 y C-PreI) fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida, tenidos con coomase coloidal y enviados al Instituto de Biología Molecular de Rosario (IBR) para el análisis proteómico por espectrometría de masas (Fig. 17).

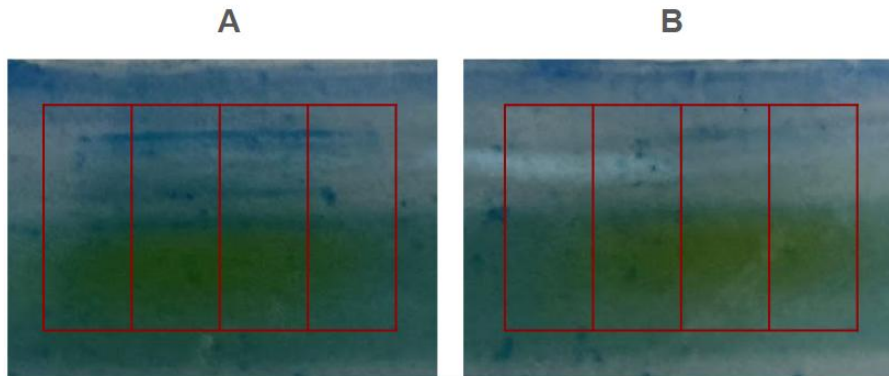


Figura 17: Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de los eluidos obtenidos tras la co-immunoprecipitación con las columnas confeccionadas con suero específico anti-TcCAL1 (A) y con suero pre-inmune (B). Los geles fueron teñidos con colorante Coomassie, mostrando el perfil de proteínas recuperadas en cada condición. Las líneas rojas indican las secciones en las que cada gel fue dividido para su posterior corte y envío al IBR para el análisis proteómico mediante espectrometría de masas.

Como resultado de este procedimiento, se identificaron péptidos correspondientes a 985 proteínas provenientes de la muestra del eluido obtenido a partir de la resina acoplada con el suero anti-TcCAL1 (E-TcCAL1), mientras que en la elución de C-PreI, se identificaron 352 (E-PreI). Se encontraron 262 proteínas en común, mientras que el resto de los péptidos se encontró exclusivamente en cada una de las muestras (Fig. 18)

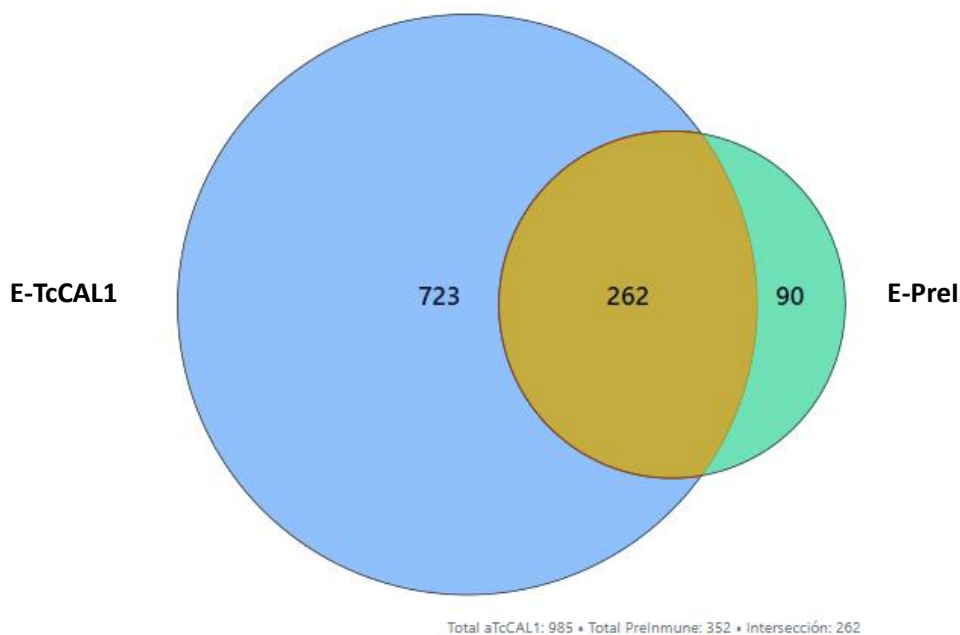


Figura 18: Diagrama de Venn de muestras E-PreI y E-TcCAL1 indicando el número de proteínas

correspondientes

La abundancia relativa que se encontró en cada muestra se expresó en términos de Peptide Spectrum Matches (PSMs), que representa la cantidad de espectros de fragmentación que se asignan a péptidos de una proteína determinada. Valores de PSM más altos implican mayor cobertura y mayor representación en la muestra, constituyendo un indicador semi-cuantitativo de la abundancia proteica.

El perfil proteómico de E-TcCAL1 mostró un enriquecimiento respecto al control E-PreI, con varias proteínas alcanzando valores de PSM elevados y diferencias significativas en su representación. Entre las más destacadas se encontró la piruvato-fosfato dikinasa (Q4E0Q0), con 57 PSMs y una abundancia más de tres veces superior a la observada en E-PreI (16 PSMs). También se identificaron distintas isoformas de proteínas de choque térmico (Q4DBM7 y Q4DTM8), con valores entre 40 y 48 PSMs, que resultaron entre tres y cuatro veces más representadas en comparación con E-PreI (15 y 14 PSMs).

Otros ejemplos relevantes incluyeron la tirosina aminotransferasa (Q4E4E7), con 35 PSMs (≈ 5 veces más abundante), y el factor de elongación 2 (Q4D3T1), con 34 PSMs (≈ 5 veces de incremento). Asimismo, algunas proteínas mostraron diferencias aún más marcadas, como la aconitato hidratasa (Q4E5G5), que alcanzó 17 PSMs frente a un único espectro en la fracción control, es decir, un aumento de 17 veces (Fig. 19).

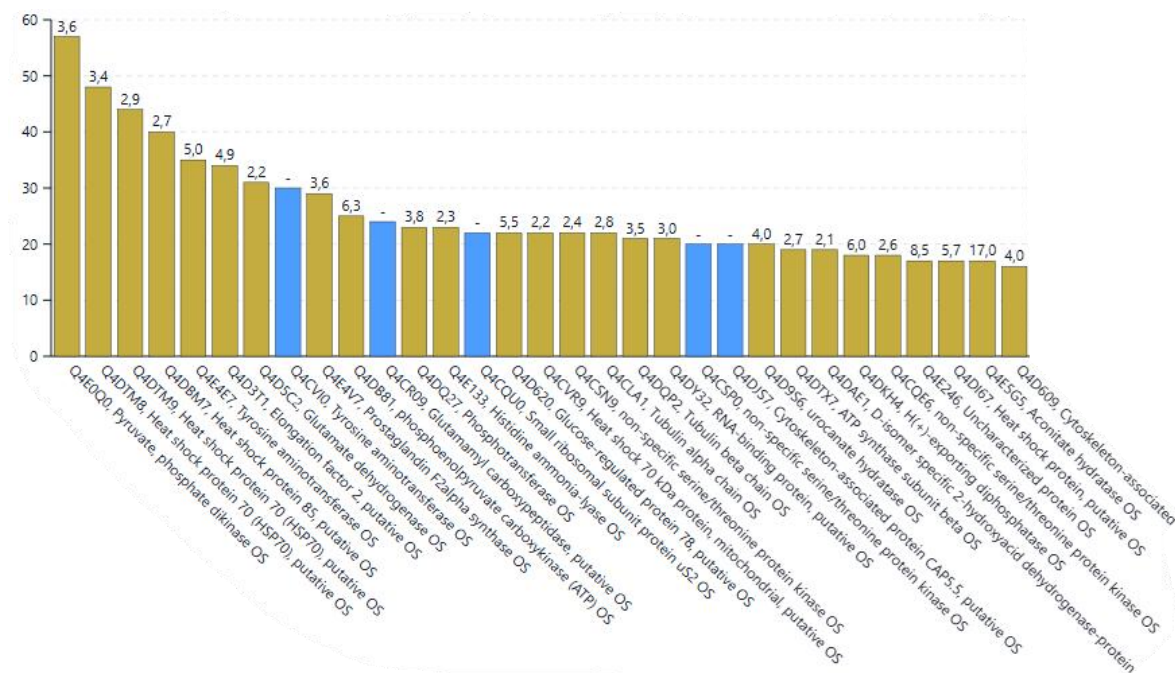


Figura 19: Proteínas identificadas en la condición E-TcCAL1. En el eje Y se representan los valores de PSMs. Las barras azules corresponden a proteínas detectadas de manera exclusiva en E-TcCAL1, mientras que las barras marrones indican aquellas compartidas con la fracción E-PreI. Adicionalmente, sobre cada barra se señala el factor de sobre-representación relativo en E-TcCAL1 respecto de E-PreI, expresado como la relación E-TcCAL1/E-PreI.

El análisis detallado de las proteínas detectadas de manera exclusiva en la condición E-TcCAL1 permitió identificar un conjunto de moléculas con valores de PSMs que oscilaron entre 9 y 30 (Fig. 20). Dentro de este grupo se encontraron enzimas metabólicas centrales como la tirosina aminotransferasa (Q4CVI0), la glutamilo carboxipeptidasa (Q4CR09), la glucosa-6-fosfato isomerasa (Q4E2M9), la fumarato reductasa (Q4CMU8), la isocitrato deshidrogenasa (Q4E4L7) y la enzima málica (Q4DJ68, Q4DV36). También se detectaron proteínas estructurales y regulatorias, como la proteína asociada al citoesqueleto (CAP5.5) (Q4DJS7) y una quinasa inespecífica de serina/treonina (Q4CSP0). A este grupo se sumaron chaperonas como las HSP putativas (Q4D673, Q4E2Q2), diversas oxidorreductasas y deshidrogenasas (Q4E5I9, Q4DSB7, Q4DFP0), así como enzimas de modificación postraduccional, entre ellas una metiltransferasa (Q4CLW8) y diferentes transaldolasas (Q4CMZ5, Q4CUD7).

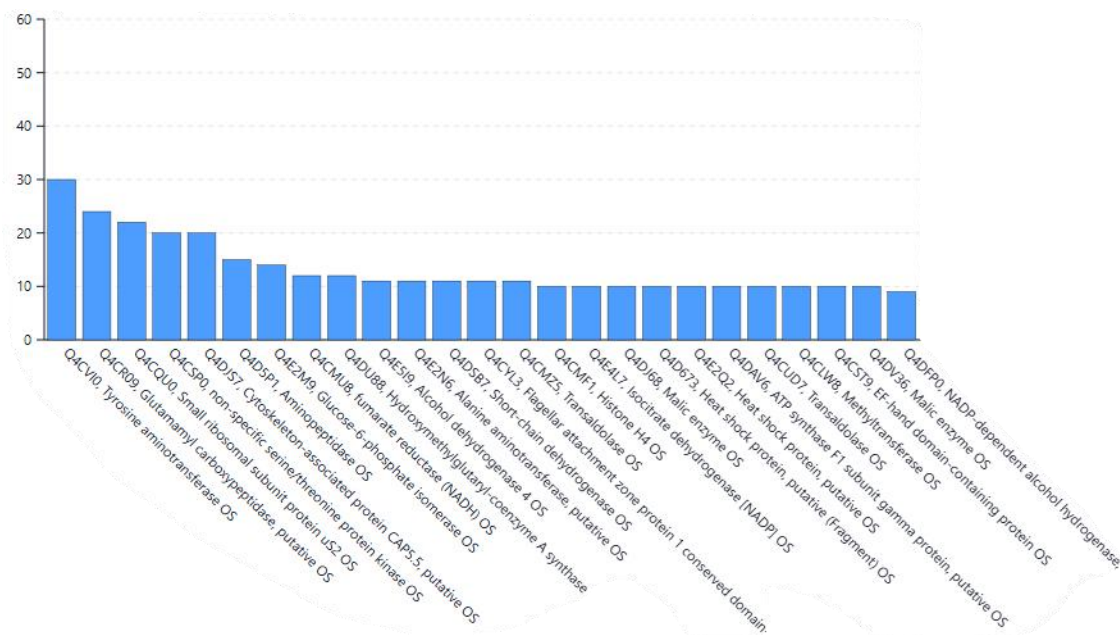


Figura 20: Proteínas identificadas exclusivamente en E-TcCAL1. La figura presenta las 25 proteínas con mayor número de PSM, en un gráfico de barras en el que el eje Y representa los valores de PSMs.

Por otro lado, se identificaron 262 proteínas que aparecen tanto en E-PreI como en E-TcCAL1. (Fig. 21) El análisis de las proteínas compartidas entre ambas condiciones reveló que, dentro de este grupo, varias se encontraron significativamente sobre-representadas en E-TcCAL1 y con valores de PSM elevados, indicando una cierta especificidad.

En primer lugar, se destacó un grupo de enzimas centrales del metabolismo energético, entre ellas la aconitato hidratasa (Q4E5G5), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Q4DB81), la piruvato-fosfato dikinasa (Q4E0Q0) y la fosfopiruvato hidratasa (Q4DZ98). Estas proteínas presentaron incrementos particularmente amplios frente al control, con diferencias que oscilaron entre 6 y 17 veces.

Un segundo conjunto estuvo constituido por enzimas vinculadas al metabolismo de aminoácidos y a reacciones de transaminación o deshidrogenación, como la aspartato transaminasa (Q4D1Q4), la aminotransferasa clase IV (Q4E589), la alanina aminotransferasa (Q4E5N8) y la glutamato deshidrogenasa (Q4D5C2). En este caso, los enriquecimientos fueron más moderados, en un rango de 3 a 8 veces.

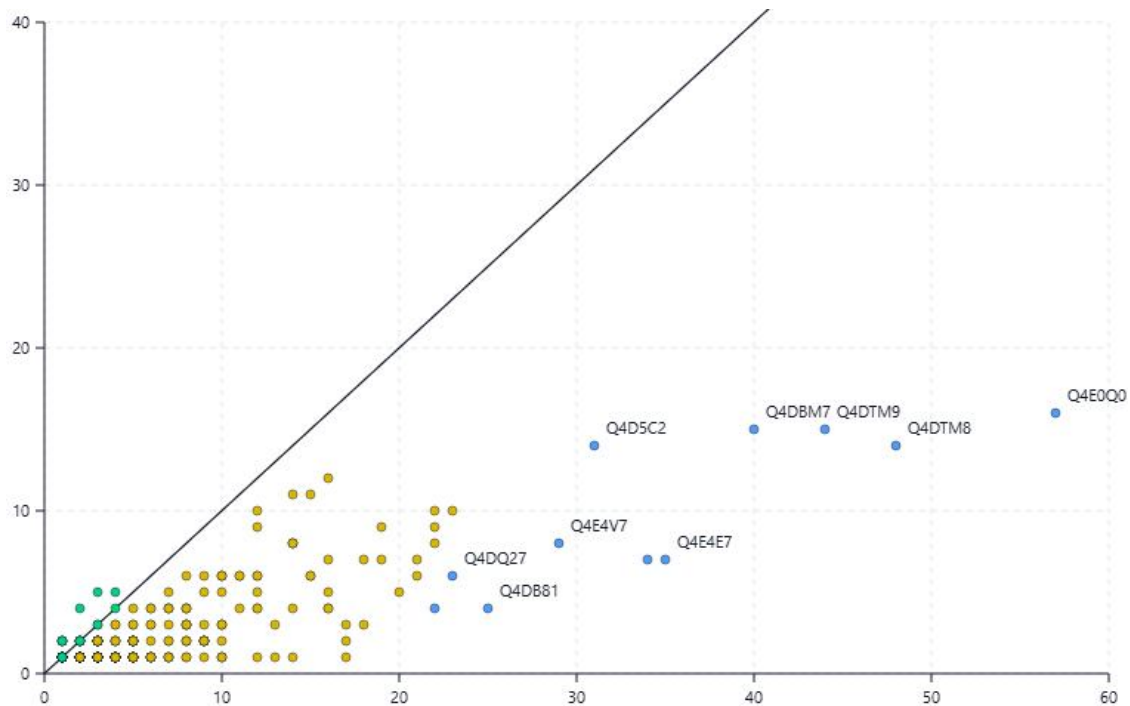


Figura 21: Análisis comparativo de proteínas compartidas entre E-PreI y E-TcCAL1. En la figura, cada punto corresponde a una proteína, ubicada de acuerdo con sus valores de PSMs en E-PreI (eje Y) y en E-TcCAL1 (eje X). La diagonal negra indica igualdad de abundancia relativa, mientras que los puntos verdes representan proteínas sobre-representadas en E-PreI, los amarillos aquellas con mayor representación en E-TcCAL1 pero con bajo número de PSMs, y los azules corresponden a proteínas altamente enriquecidas en E-TcCAL1.

Las proteínas chaperonas y de respuesta al estrés también tuvieron un papel destacado, particularmente miembros de las familias HSP70 (Q4DTM8, Q4DTM9) y HSP85 (Q4DBM7), que se detectaron con valores de PSM muy elevados y enriquecimientos de aproximadamente 2,5 a 3,5 veces respecto del control.

Con respecto a la comparación de la identificación de péptidos en este sistema experimental y a las interacciones previamente sugeridos por los ensayos de doble híbrido en levaduras, el análisis comparativo entre las co-IP provenientes de las muestras E-TcCAL1 y E-PreI mostró una presencia diferencial de péptidos en cada condición,

En primer lugar, el análisis de E-TcCAL1 permitió detectar cuatro péptidos que corresponden a la proteína TcCAL1, y una ausencia de estos en la muestra E-PreI (Tabla 1). Dos de estos péptidos se asociaron a números de acceso distintos (Q4CST9 y Q4CS95), que corresponden a las copias homologas de TcCAL1 en cada cromosoma haploide de *T. cruzi*. Este resultado valida la capacidad del ensayo de capturar a la proteína blanco de manera específica.

Doble híbrido de levadura	E-TcCAL1	E-PreI
TcCAL1 ID: Q4CST9	4 péptidos iguales de TcCAL1 ----- ID Q4CST9 ; Q4CS95	--
TcPFD ID: Q4E4M8	3 péptidos de Prefoldina ----- ID: Q4CTB4; Q4E0R9 ----- ID: Q4DIX0; Q4DMH3 ----- ID: Q4DVG6; Q4DJ99	1 péptido de Prefoldina ----- ID: Q4E266
TcARM ID: Q4DWP4	1 péptido de Armadillo ----- ID: Q4DWP4	--

Tabla 1: Tabla comparativa de proteínas identificadas en el ensayo de doble híbrido en levaduras (H2Y) y los péptidos identificados en las muestras de Co-IP.. Se incluyen los códigos de identificación de cada proteína y el número de péptidos encontrados en cada muestra (ID).

En lo que respecta a la TcPFD, se identificaron tres péptidos en la muestra E-TcCAL1. Si bien cada uno de estos péptidos corresponde a diferentes subunidades que conforman el complejo de prefoldinas, esto resulta esperable dada la naturaleza heterohexamérica de esta chaperona. De este modo, cada péptido identificado podría asignarse de manera simultánea a dos proteínas distintas que comparten dicha secuencia, lo que indica que no se trata simplemente de múltiples lecturas de una misma proteína, sino de la detección paralela de diferentes subunidades que potencialmente integran el complejo prefoldina. En contraposición, en la muestra proveniente de E-PreI, se identificó un único péptido de prefoldina (Q4E266).. Esta diferencia cuantitativa entre ambas condiciones sugiere que la asociación entre TcCAL1 y prefoldina es específica y reproducible con distintos abordajes experimentales, validando los resultados obtenidos en el ensayo de doble híbrido.

En cuanto a TcARM, se identificó un único péptido en la muestra E-TcCAL1 (Q4DWP4), mientras que en el control E-PreI no se detectó ninguno. Nuevamente, este resultado, aunque más limitado en número de péptidos, refuerza los hallazgos encontrados en la técnica de doble híbrido, y sugiere que TcCAL1 interacciona también con esta proteína.

5.3. Construcción de un sistema de detección de interacciones *In vivo*.

Para abordar la identificación de posibles proteínas de asociación a TcCAL1 en su entorno nativo, se implementó la estrategia de biotinylation dependiente de proximidad (BioID). Con este fin, se procedió al diseño y validación de constructos basados en el sistema de expresión inducible regulado por tetraciclina en *T. cruzi*, utilizando el vector pTcINDEX, (Fig. 7). En dicho vector se clonó una versión mutada de la ligasa de biotina BirA*, fusionada la proteína de interés. En este trabajo se generaron dos vectores: pTcINDEX-myc-BirA-TcCAL1, que contiene la secuencia que codifica para TcCAL1 fusionada en su extremo C-terminal a BirA, y pTcINDEX-myc-BirA-GFP, como control negativo para discriminar biotinylationes inespecíficas.

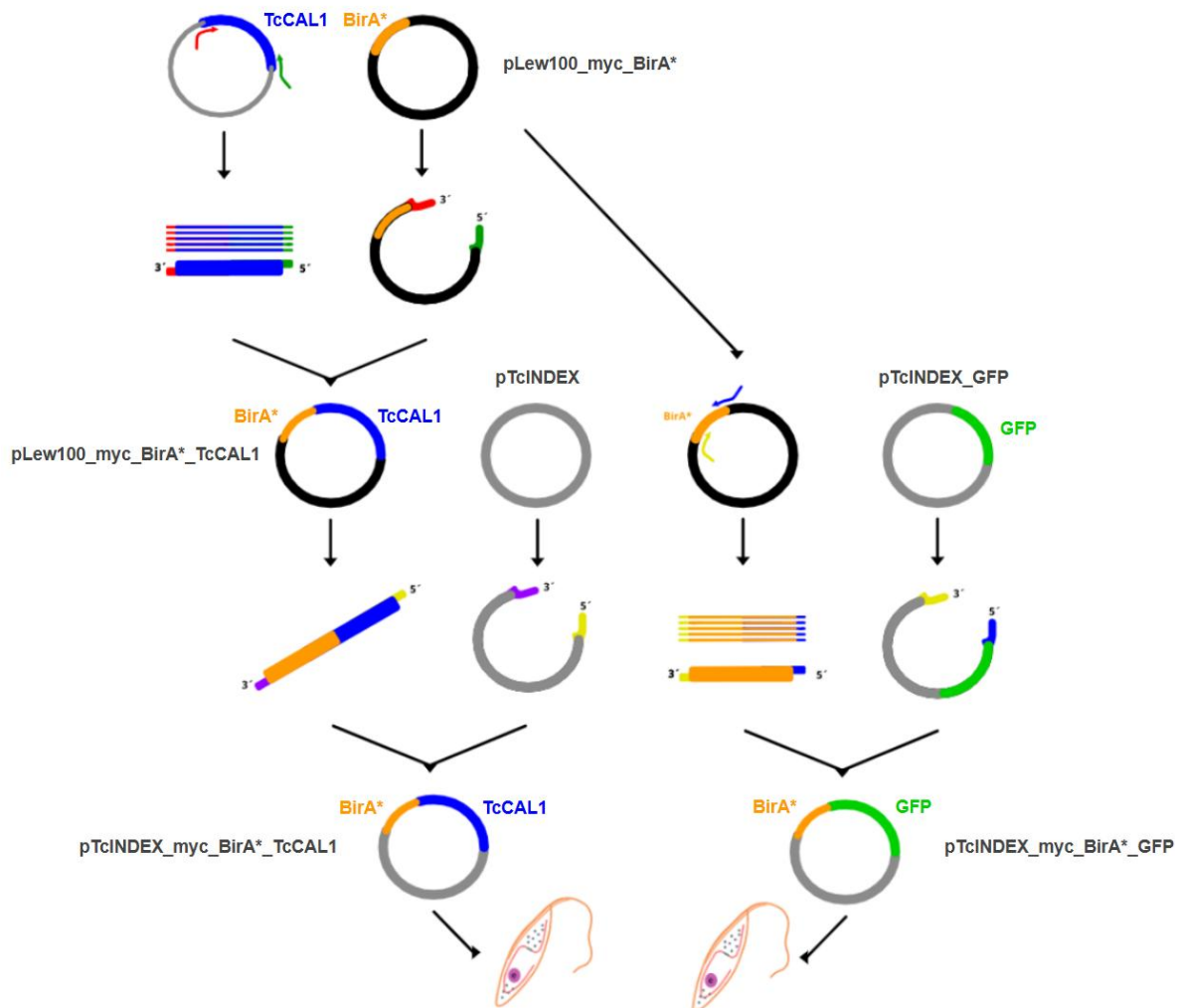


Figura 7: Estrategia de construcción de vectores para BioID en *T. cruzi*. El esquema ilustra el diseño y generación de dos vectores para el análisis del interactoma de TcCAL1 mediante biotilación dependiente de proximidad (BioID).

En primer lugar, la secuencia que codifica para TcCAL1 se clona en el vector pLew100_myc-BirA* que contiene la ligasa de biotina BirA*, fusionada a un epítopo de detección myc. (región de fusión myc-BirA). Dicha secuencia de TcCAL1 fue amplificada por PCR a partir de ADN genómico de *T. cruzi*, empleando oligonucleótidos con sitios de restricción que aseguren la orientación y marco de lectura correctos. Tanto el fragmento amplificado y purificado como el vector pLEW100-myc-BirA* (Anexo, Fig. 22) fueron digeridos con las mismas enzimas y posteriormente ligados con la enzima T4 DNA ligasa.

La mezcla de ligación obtenida se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*, y las colonias obtenidas fueron analizadas mediante digestión de restricción y electroforesis en gel de agarosa (Fig. 8), confirmando el patrón de bandas esperado, incluyendo la liberación de una banda de aproximadamente 1,1 kb correspondiente a una región del inserto, y validando la correcta inserción de la secuencia de TcCAL1 en el plásmido final pLEW100-myc-BirA-TcCAL1 por secuenciación (Fig. 9). Como resultado, se obtuvo una identidad completa comparada con la construcción teórica, sin mutaciones puntuales ni inserciones que alteraran el marco de lectura de la propia secuencia TcCAL1, también se observa que la fusión entre la secuencia de la enzima biotín ligasa y la proteína de interés se encuentran en el mismo marco de lectura. (Fig. 10).

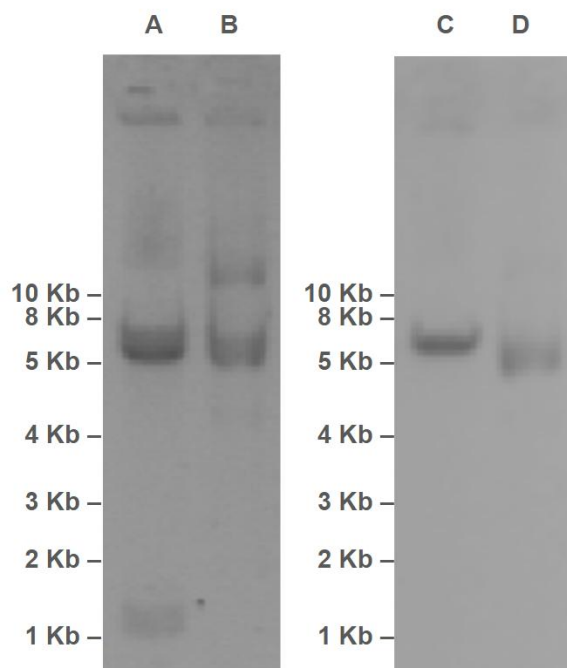
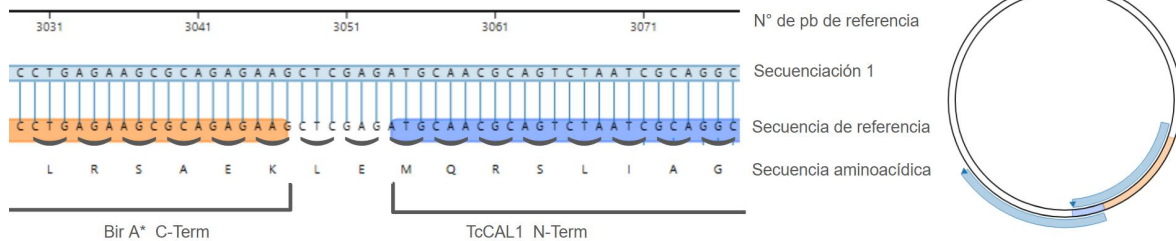
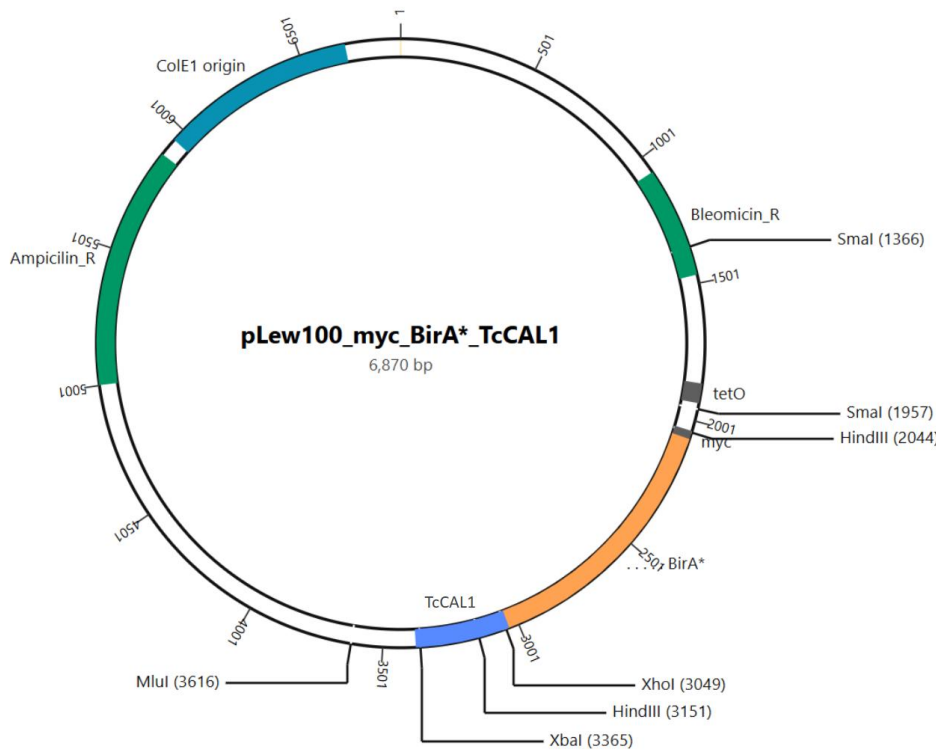


Figura 8: Análisis del clonado de la secuencia TcCAL1 en el vector pLew100-myc-BirA*. El gel de agarosa muestra, en la calle A, el producto de la digestión enzimática con HindIII de la construcción pLew100-myc-BirA*-TcCAL1, mientras que en la calle B se observa la misma construcción sin tratamiento enzimático. En la calle C se presenta la digestión con HindIII del vector pLew100-mycBirA*, y en la calle D, el vector sin digerir.

Figura 9: Vector pLew100_myc_BirA*_TcCAL1



A

B

Figura 10: Resultados del análisis de secuenciación Sanger de un clon obtenido del pLew100-mycBirA*. (A): alineamiento de secuencia de nucleótidos obtenida y secuencia teórica. Se muestra también la secuencia de aminoácidos teórica, que evidencia que no hay corrimiento del marco de lectura. (B). Se muestra la región del plásmido secuenciada.

Una vez obtenida la secuencia de fusión myc-BirA-TcCAL1, se aisló del plásmido mediante digestión enzimática. Con las mismas enzimas de restricción se digirió el vector pTcINDEX (Anexo, Fig. 23), generando extremos compatibles para el sub-clonado del fragmento de interés. El fragmento y vector fueron purificados por separado y posteriormente ligados utilizando T4 DNA ligasa. La mezcla de ligación obtenida se utilizó para transformar *E. coli*, y se seleccionaron clones para analizar mediante restricción (Fig. 11). Posteriormente se

seleccionó un clon para analizar por secuenciación, confirmando el correcto clonado y obtención del vector pTcINDEX-myc-BirA-TcCAL1 (Fig. 12).

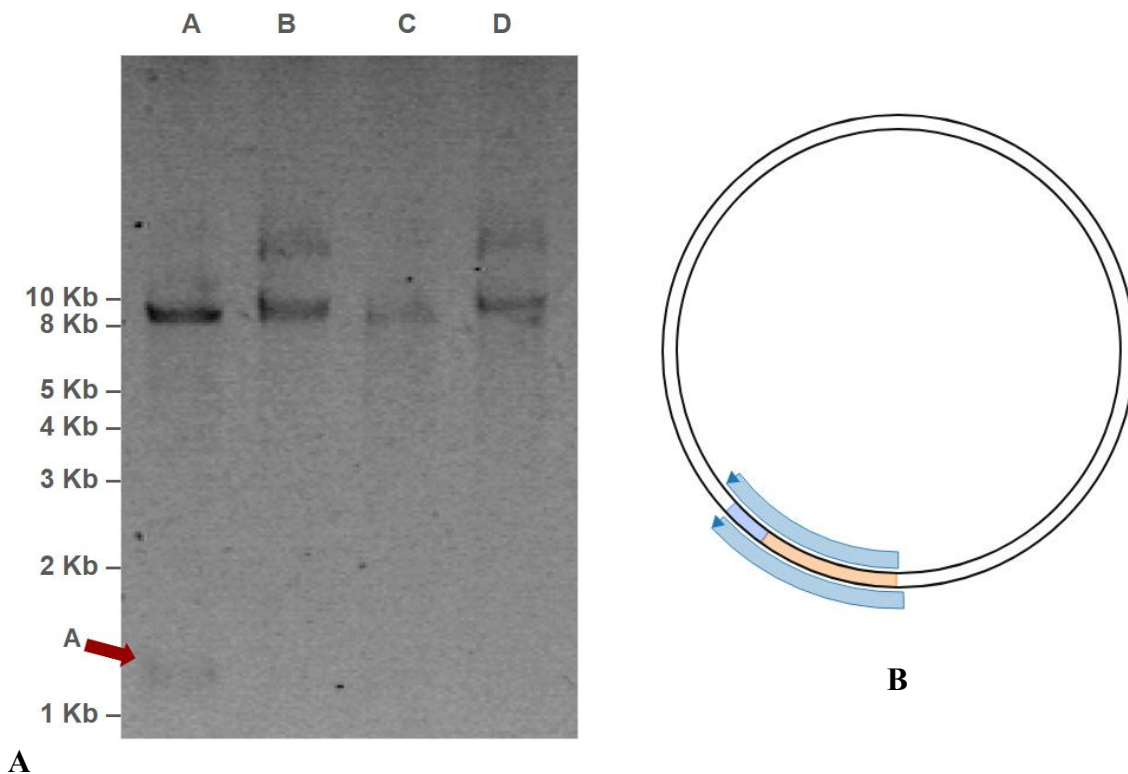
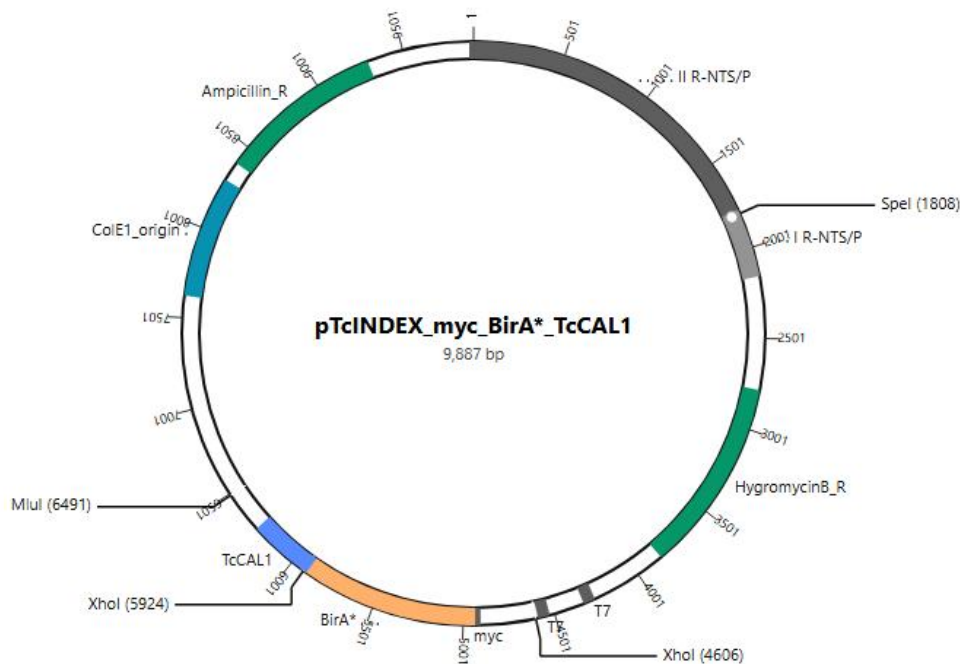


Figura 11: Validación del clonado del fragmento de fusión BirA*-TcCAL1 en el vector pTcINDEX. (A): se presenta un gel de agarosa, en la calle A, el producto de la digestión enzimática con XhoI de la construcción pTcINDEX-myc-BirA*-TcCAL1, donde se indica la liberación de una banda de aproximadamente 1,3 kb correspondiente a una región del inserto; en la calle B se observa la misma construcción sin digerir. La calle C corresponde a la digestión con XhoI del vector pTcINDEX, y la calle D al vector sin digerir. En el panel B se muestra un esquema del análisis de secuenciación del vector pTcINDEX-myc-BirA*-TcCAL1, obtenido mediante los oligonucleótidos For-BirA y Rev-TcCAL1. **(B).** El mapa presenta el esqueleto del vector representado con líneas negras, destacando la secuencia myc-BirA* en color naranja y TcCAL1 en color azul, así como la región amplificada por los cebadores, indicada en color celeste.

Figura 12: Vector pTcINDEX_myc_BirA*_TcCAL1



En paralelo, se construyó un vector pTcINDEX conteniendo la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a la enzima BirA*, para ser utilizado como control de biotinizaciones inespecíficas. La secuencia que codifica para la región myc-BirA fue aislada del vector pLew100_myc_BirA* y sub-clonada en el vector pTcINDEX-GFP (Anexo, Fig. 24), el cual ya contenía la secuencia para la proteína GFP. Este clonado se realizó de manera direccional, asegurando que la región amplificada quedara en el marco de lectura correcto y evitando integraciones no deseadas.

Luego, la región myc-BirA amplificada por PCR y el vector pTcINDEX-GFP se digirieron con las mismas enzimas y posteriormente purificados. Luego se realizó la ligación de ambos fragmentos, con la subsiguiente transformación en bacterias y la obtención de clones aislados. A partir de minipreparaciones de ADN plasmídico, se realizaron digestiones y secuenciación para corroborar la ausencia de interrupciones del marco de lectura y la apropiada fusión con GFP (Fig. 13 y Fig. 14). Como resultado, se obtuvo el vector recombinante pTcINDEX-myc-BirA-GFP, diseñado para expresar de manera inducible la proteína fluorescente verde fusionada a la ligasa BirA* (Fig. 15).

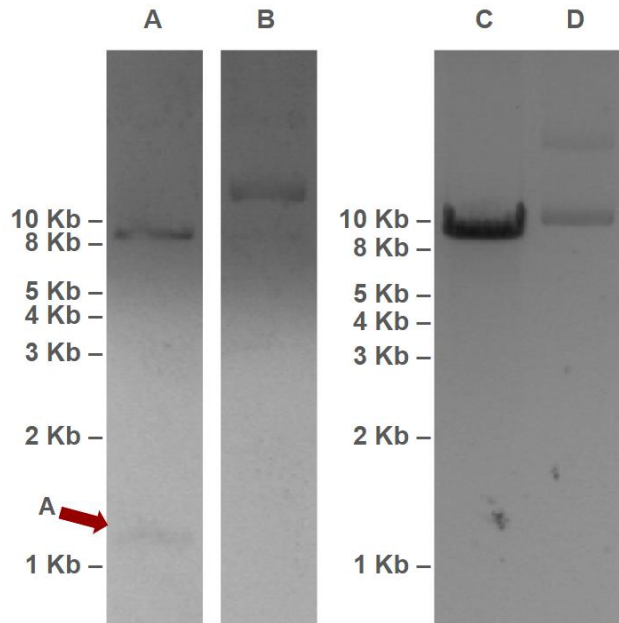


Figura 13: Validación del clonado de la secuencia BirA* en el vector pTcINDEX-GFP. El gel de agarosa muestra, en la calle A, el producto de la digestión enzimática con XhoI de la construcción pTcINDEX-myc-BirA*-GFP, donde se indica la liberación de una banda de aproximadamente 1,1 kb correspondiente a una región del inserto, mientras que en la calle B se observa la misma construcción sin tratamiento enzimático. En la calle C se presenta la digestión con XhoI del vector pTcINDEX-GFP, y en la calle D, el vector sin digerir.

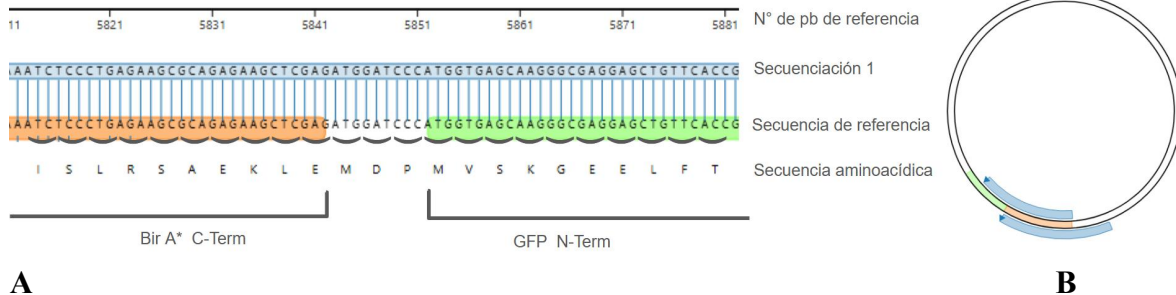


Figura 14: Análisis de secuenciación Sanger realizado sobre un clon derivado del plásmido pTcINDEX_myc_BirA*_GFP. (A): Comparación entre la secuencia nucleotídica experimental y la esperada según el diseño teórico. Asimismo, se incluye la traducción a aminoácidos correspondiente, la cual confirma que el marco de lectura se conserva sin desplazamientos. (B). Se muestra la región del plasmido secuenciada.

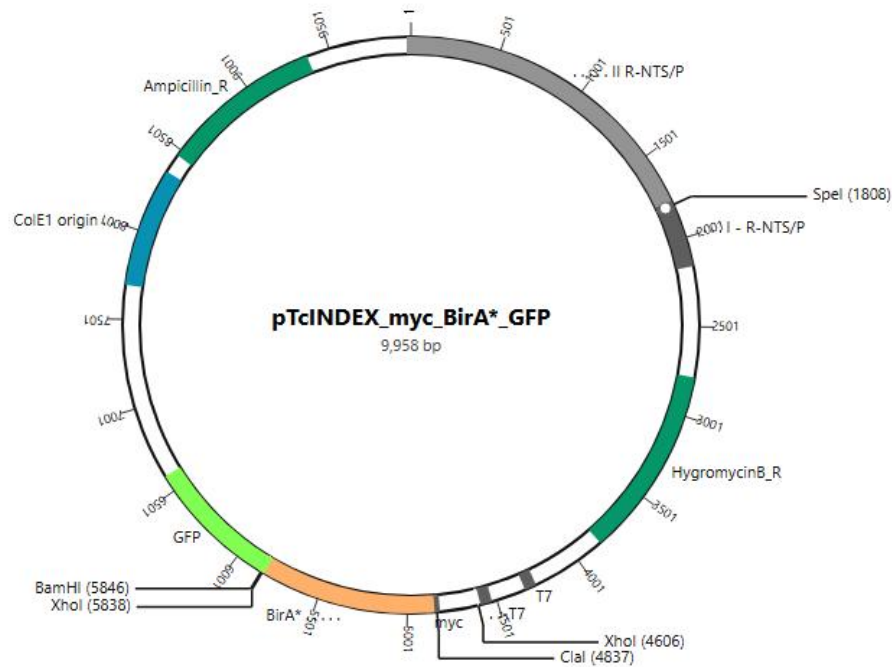


Figura 15: Vector pTcINDEX_myc_BirA*_GFP

Una vez obtenidos los vectores pTcINDEX-myc-BirA-TcCAL1 y pTcINDEX-myc-BirA-GFP, se linearizaron por restricción 20 microgramos de cada vector, y se transformaron por separado en epimastigotes de la cepa Dm28c pLew, que contiene los elementos necesarios para la expresión inducible de las proteínas de fusión.

6. Discusión

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar el entorno molecular de TcCAL1, una proteína de bajo peso molecular (~ 12.5 kDa) con motivos EF-hand en *Trypanosoma cruzi*, integrando estudios *in silico* con abordajes experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*. Como resultado, este estudio permitió: (i) se muestran predicciones que permiten proponer un modelo estructural-funcional para TcCAL1, su unión a Ca^{2+} y su asociación con dos posibles interactores; (ii) identificar candidatos de interacción por co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas (co-IP/MS); (iii) desarrollar un sistema de expresión inducible para la técnica de biotilación por proximidad (BioID). En este trabajo demostramos que las posibles moléculas que se asocian a TcCAL1, identificadas por doble híbrido en levaduras, también son detectadas de manera específica mediante el abordaje de co-IP/MS. Además, también se muestran modelados que permitirían sugerir cómo distintas MPT pueden o no, modular la interacción con estas proteínas.

En primer lugar, en el análisis *in silico* se generaron modelos tridimensionales mediante AlphaFold3, se identificaron los sitios de unión a Ca^{2+} en la estructura de TcCAL1 con el servidor COACH y se inspeccionaron en detalle los posibles cambios conformacionales inducidos. A partir de estos modelos se simuló además la interacción de TcCAL1 (en sus distintas variantes modificadas) con complejos formados por TcPFD o con TcARM, integrando predicciones espaciales, localización de iones y evaluación de regiones hidrofóbicas.

Para predecir la unión a Ca^{2+} , los modelos *in silico* sugieren que TcCAL1 adopta una estructura estable en sus motivos EF-hand en presencia de estos átomos, apoyando su función de sensor. En EF-hands canónicos, Ca^{2+} suele coordinarse en una bipirámide pentagonal con residuos de Glu/Asp en posición 12, actuando como ligando bidentado. Esta disposición en la coordinación de estos cationes es conocida en la familia EF-hand y explica la selectividad por Ca^{2+} frente a Mg^{2+} (Allouche et al., 1999). Variantes no canónicas (como las que sugiere TcCAL1) pueden conservar afinidad por Ca^{2+} con geometrías alternativas, modulando afinidades y selectividad frente a Mg^{2+} (Gifford et al., 2007).

Es interesante mencionar que no se logró ubicar el ion Ca^{2+} en los típicos bucles formados por los dominios Ef-hand de TcCAL1 empleando AlphaFold3, ya que este servidor predecía una asociación en otras regiones de la proteína. En consecuencia, se emplearon servidores especializados en la predicción de asociación a ligando o cofactores como el programa COACH. El resultado obtenido con este último servidor es consistente con los resultados mencionados en los antecedentes, donde observamos que tanto por métodos *in vitro* como *in vivo*, la versión recombinante de TcCAL1 (TcCAL1x6His) exhibe capacidad de unión a Ca^{2+} .

También, se modelaron tanto las proteínas TcARM y TcPFD, encontradas previamente como interactores de TcCAL1 en ensayos de doble híbrido de levadura. En este trabajo se evaluaron sus conformaciones y superficies de contacto en conjunto con el modelo de TcCAL1 para simular posibles escenarios de interacción. Por un lado, las simulaciones posicionaron a TcCAL1 dentro del hueco formado por el hexámero de prefoldinas. Dado que la molécula de TcCAL1 que se asocia al complejo TcPFD se encuentra en una conformación nativa, esta interacción podría, sugerir que TcCAL1 actúa como un posible modulador de la actividad PFD, y esta modulación podría ser dependiente o no, de la presencia de iones Ca^{2+} (Thamaz et al., 2023).

Es importante mencionar que una de las principales limitaciones del modelado de la interacción TcCAL1–TcPFD fue que solo pudo representarse un complejo homohexamérico, formado por una misma subunidad (aquella identificada en ensayos de Y2H). En eucariotas, el complejo nativo es un heterohexámero compuesto por seis subunidades diferentes (dos de tipo α y cuatro de tipo β) organizadas en una estructura de morfología similar a una medusa, con tentáculos de coiled-coil capaces de capturar cadenas nacientes y transferirlas, por ejemplo, a otras chaperonas citosólicas, como la TCP-1 Ring Complex / Chaperonin Containing TCP-1, o TRiC/CCT (Martin-Benito, 2002; Siegert et al., 2000). Estructuras por microscopía electrónica de PFD-CCT muestran que PFD se acopla a subunidades específicas de CCT en arreglo 1,4 por anillo, restringiendo geometrías de entrega, que son las posiciones y orientaciones específicas con las que prefoldina puede acercarse y transferir una proteína al complejo CCT para su plegado. (Simons et al., 2004). Por tanto, sería interesante en un futuro, contar con predictores capaces de simular la interacción empleando heterohexameros formados por las subunidades tipo α o β de PFD presentes en *T. cruzi*, y evaluar la interacción

con TcCAL1. Se estudió también el efecto de la fosforilación de la Serina 4 de TcCAL1 en la estabilidad de la asociación con el hexámero de PFD.

Los resultados del modelado *in silico* con las MPT mencionadas y sus interactores indicaron que la fosforilación en S4 de TcCAL1 afecta negativamente su interacción con el complejo de prefoldina. Las simulaciones sugieren que esta modificación no solo altera la conformación intrínseca de la proteína, sino que también modifica directamente su modo de interacción con el complejo PFD. Cuando TcCAL1 está fosforilada, no puede ser capturada en el sitio de captura del hexámero PFD, desestabilizando dicha interacción, y las simulaciones muestran que la interacción se desplaza hacia la periferia del complejo, en una conformación inestable.

Luego, se evaluó también el impacto de la palmitoilación, sobre la conformación estructural de TcCAL1. La unión covalente de ácido palmítico a residuos de cisteína es una MPT reversible que juega un papel muy importante en la función proteica, ya que regula la estabilidad, tráfico intracelular e interacción con otros componentes (Aicart-Ramos et al., 2011). Esta modificación fue simulada mediante una doble palmitoilación dado que TcCAL1 posee dos cisteínas adyacentes. En *T. cruzi*, el FCaBP (Flagellar Calcium-binding Protein) es un sensor EF-hand miristoilado y palmitoilado; ambas acilaciones son necesarias para el direccionamiento a membrana flagelar y para su asociación a balsas lipídicas (*lipid rafts*) y especificidad subcelular (Godsel y Engman, 1999). Estos precedentes sostienen la posibilidad de que TcCAL1 pueda emplear una MPT de carácter lipídico, e incluso una doble palmitoilación sobre residuos adyacentes, como parte de su regulación funcional (por ejemplo, en dos cisteínas en tándem, como se realizó en esta tesis). El hecho de que en levaduras la proteína Vac8 requiere únicamente dos cisteínas para lograr un anclaje robusto y funcional (posición y número importan) refuerza la plausibilidad de doble palmitoilación concertada como interruptor de localización/función (Subramanian et al., 2006).

De forma complementaria, la simulación de TcCAL1 con una palmitoilación doble mostró un efecto aún más disruptivo: no solo se perdió la capacidad de unión al hueco central del complejo TcPFDx6, sino que además se forzó una unión anómala que indujo distorsiones estructurales en la conformación de la Prefoldina, comprometiendo su topología natural de captura. Estas observaciones sugieren que tanto la fosforilación como la palmitoilación

pueden actuar como mecanismos de exclusión funcional, desplazando a TcCAL1 del complejo TcPFD.

No obstante, la interpretación de estas distorsiones estructurales inducidas por la doble palmitoilación debe ser analizada críticamente a la luz de las limitaciones biofísicas intrínsecas de los algoritmos de predicción estructural. Si bien herramientas como AlphaFold 3 han revolucionado el modelado de complejos moleculares al permitir la incorporación explícita de modificaciones postraduccionales y ligandos, el algoritmo ejecuta sus procesos de difusión y optimización geométrica asumiendo un microambiente de solvatación acuoso e implícito, careciendo de una representación física de las bicapas lipídicas. Al insertar *in silico* cadenas alifáticas altamente hidrofóbicas en un entorno puramente acuoso, se desencadena una severa penalidad entrópica que el modelo resuelve forzando un “colapso”, obligando a los lípidos a invadir cualquier cavidad proteica adyacente (como el hueco central de TcPFD). Además, es fundamental destacar una limitación clave de esta predicción para evaluar el cambio de conformación al unirse a la membrana: el ácido palmítico es un compuesto lipídico y no una secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, carece de la variabilidad y movilidad que los modelos de inteligencia artificial utilizan para predecir alteraciones conformacionales, a diferencia de lo que ocurre con las proteínas transmembrana clásicas. Sumado a esto, una limitación crítica de esta predicción es que actualmente no existen ensayos experimentales que validen de manera empírica la variación de la conformación tridimensional de TcCAL1 al estar modificada postraduccionalmente. En el contexto celular de *T. cruzi*, la palmitoilación actuaría primariamente como un anclaje a membranas, segregando espacialmente a TcCAL1 del complejo citosólico TcPFD y evitando el choque estérico destructivo observado *in silico*.

En este sentido, la evidencia experimental demuestra que la palmitoilación es un determinante topológico y estructural clave que puede afectar la localización, la conformación tridimensional y la afinidad por otras proteínas. Un ejemplo clásico es la GTPasa Ras. Su palmitoilación no solo permite su anclaje a la membrana, sino que induce cambios conformacionales y una reorientación espacial de su dominio catalítico respecto a la bicapa lipídica, lo cual condiciona directamente con qué proteínas efectoras puede interactuar en distintos microdominios (Nair et al., 2021). Por consiguiente, se corrobora la necesidad de

someter los modelos estáticos de TcCAL1 a simulaciones de dinámica molecular en entornos de membrana para validar su viabilidad estructural

Estudios experimentales en tripanosomatidos mostraron un mecanismo de relocalización dinámica que rige a la proteína asociada al citoesqueleto CAP5.5. Esta molécula carece de dominios transmembrana intrínsecos y reside en el citosol, pero sufre una acilación dual (miristoilación y palmitoilación) que provoca un cambio en su estado de asociación, anclándola firmemente a la membrana pelicular para interactuar con los microtúbulos (Hertz-Fowler et al., 2001). Notablemente, esta misma proteína fue identificada de manera exclusiva en los ensayos de co-inmunoprecipitación de este trabajo. Este comportamiento funcional también es compartido por la proteína sensora de calcio FCaBP, donde la unión de calcio a sus dominios EF-hand induce un profundo cambio conformacional que expone sus grupos acilo previamente secuestrados, operando como un “interruptor” que le permite insertarse en la membrana flagelar e interactuar selectivamente con sus blancos específicos (Wingard et al., 2008). Al evaluar estos ejemplos, resulta evidente cómo la palmitoilación afecta profundamente el plegamiento y la red de interacciones de una proteína. En conjunto, estos antecedentes respaldan el concepto de que la palmitoilación en TcCAL1 funcionaría como un interruptor de localización que altera su forma tridimensional para sustraerla de interacciones solubles y acoplarla a membranas, un fenómeno dinámico que requiere simulaciones en entornos lipídicos para ser modelado con precisión.

Por otro lado, los análisis *in silico* de la interacción entre TcCAL1 y TcARM mostraron que TcCAL1 se posiciona en un segmento no citosólico de TcARM, estableciendo una interacción que no altera la estructura de la proteína armadillo. En este contexto, el extremo C-terminal de TcARM (que incluye un segmento transmembrana seguido de una región citosólica), permanece estructuralmente conservado. Sin embargo, la interacción con TcCAL1 podría interferir con la accesibilidad del surco de unión característico de las repeticiones ARM, compitiendo de manera directa con otros posibles ligandos por ese mismo sitio. Este mecanismo de competencia, y no un reordenamiento de los dominios ARM (que no se observó en las simulaciones), sería el responsable de modular el reclutamiento de socios proteicos que interactúan con dicha hendidura.

En contraste a lo observado para TcPFDx6, las interacciones simuladas entre TcCAL1 y TcARM resultaron independientes de la presencia o ausencia de MPT. En otras palabras, la proteína TcARM siempre presentó un hueco central para la interacción con TcCAL1, independientemente de la presencia de ácidos palmíticos o fosforilación. Esto podría indicar que TcARM es una molécula que interacciona de manera más estable con TcCAL1, especialmente en escenarios donde la palmitoilación favorece su anclaje a membranas subcelulares, pero de manera reversible. En conjunto, se puede plantear la hipótesis que diferentes MPTs de TcCAL1 podrían aportar diversificación funcional a la proteína: la fosforilación podría exponer superficies polares inhibiendo la asociación con TcPFD, mientras la palmitoilación podría favorecer la interacción con contactos TcARM, acercándola a distintas membranas intracelulares. En este sentido, la doble palmitoilación puede funcionar como un mecanismo que alterna entre un estado “prefoldina-accesible” (más soluble/citosólico) sin palmitoilación en TcCAL1, y uno “ARM/membrana-accesible” (anclado) con palmitoilación, modulando de manera dinámica el repertorio de interactores de TcCAL1.

En nuestro laboratorio, observamos que la región TcARM₃₀₀ se localiza en una zona de *T. cruzi* compatible con la vacuola contráctil (CVC) del parásito (Rodríguez Durán, 2024), una organela implicada en el direccionamiento de proteínas y en la osmorregulación (Rohloff y Docampo, 2007). Si bien aún desconocemos la localización de la proteína TcARM completa, el hecho de que TcCAL1 se pueda asociar o anclar transitoriamente a membranas por medio de palmitoilación, podría explicar el mecanismo por el cual una proteína citosólica interacciona de manera estable con otra que contiene un paso transmembrana. Sería interesante determinar experimentalmente, cuál es la región u organela en la que reside TcARM. También es interesante plantear que el ion Ca²⁺ podría modular la interacción TcCAL1-Tc ARM, participando directa o indirectamente en procesos dependientes de osmolaridad, estableciendo una relación entre la señalización dependiente de este ion y la localización. Esto se ha reportado en otros estudios, como en la proteína de unión a Ca²⁺ FCaBP, que se asocia a la membrana flagelar en función del Ca²⁺ (Wingard et al., 2008).

Complementariamente se realizaron simulaciones estructurales del fragmento TcARM₃₀₀, donde los resultados indicaron que, tanto en presencia como en ausencia de palmitoilación en TcCAL1, la proteína tiende a interactuar en una región de TcARM₃₀₀ muy cercana al sitio donde la molécula continúa hacia su dominio transmembrana. Como la simulación no incluye la proteína completa, TcCAL1 parece unirse a un sitio que, en la proteína real in vivo, probablemente estaría ocupado o bloqueado por la propia cadena que sigue hacia la membrana. Esta restricción estructural evidencia que los programas de predicción estática sobre fragmentos truncados pueden sobreestimar afinidades en regiones artificialmente expuestas, haciendo indispensable en el futuro la realización de simulaciones que contemplen a la proteína en su longitud total.

Es importante mencionar que al menos en nuestro conocimiento, no se dispone de información experimental de caracterización estructural o funcional sobre las subunidades o complejos formados por PFD en *T. cruzi* o en el resto de los tripanosomas (Kumar et al., 2020). Lo mismo ocurre con la proteína TcARM. Si bien ambas moléculas se han detectado en estudios de proteoma de *T. cruzi*, lo que significa que se expresan activamente, se desconoce su función.

Por otro lado, y como resultado del abordaje experimental de este trabajo, se logró realizar una inmunoprecipitación utilizando un anti-suero específico contra TcCAL1 con posterior análisis mediante espectrometría de masa para identificar si entre las proteínas co-eluidas, se encontraban TcARM y/o TcPFD. Como control de este análisis, se empleó en paralelo una resina conteniendo un suero pre-inmune, con el fin de identificar las moléculas que se co-eluyeron con TcCAL1. En una primera instancia, se corroboró que las inmunoglobulinas IgG presentes en el suero anti-TcCAL1 y control, se acoplaran covalentemente a la resina de proteína A-Agarosa. Un indicio preliminar de la especificidad de la muestra de interés, fue la presencia de TcCAL1 en la elución empleando la resina con anti-TcCAL1, en comparación a la ausencia de señal en el control PreI. El hallazgo más importante de este experimento es que se detectó la presencia de TcARM exclusivamente en la resina C-TcCAL1, y un enriquecimiento de TcPFD con respecto a la resina control.

La identificación de péptidos correspondientes a TcPFD y TcARM coincide con los hallazgos del abordaje empleando la técnica de doble híbrido en levaduras, empleando TcCAL1 como

carnada (Rodríguez Durán, 2024). Este resultado es una validación preliminar para diseñar un próximo experimento, denominado cuantificación libre de marcaje o LFQ (por sus siglas en inglés de Label-Free Quantification). Este experimento es similar al realizado, pero cuenta con réplicas biológicas (típicamente cuadruplicados), que permitan ponderar cuantitativamente la presencia de péptidos en una muestra con respecto a los controles (Guzman et al., 2024). Se espera que con el abordaje confirme de manera cuantitativa las asociaciones previamente estimadas. Con la aplicación de LFQ (Label-Free Quantification, cuantificación sin marcaje), la lista de candidatos se transforma en una red ponderada, en la que cada interacción se jerarquiza según su abundancia relativa y reproducibilidad. Usando algoritmos como MaxLFQ se obtienen valores de \log_2 FC (cambio de pliegue en base 2) y pruebas estadísticas corregidas por FDR (tasa de descubrimiento falso), lo que permite distinguir interacciones constitutivas, condición-dependientes (p. ej., presencia de Ca^{2+}) y candidatos de baja abundancia, pero reproducibles (Cox et al., 2014). Así, LFQ convierte un catálogo de proteínas en una red cuantitativa y robusta, acercando los resultados a estándares publicables.

El abordaje adoptado en esta tesis, basado en la inmovilización covalente del anticuerpo anti-TcCAL1 a una resina de proteína A-agarosa mediante DSS, se encuentra respaldado por protocolos recientes de inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas. En particular, el flujo de trabajo descrito en *IP-to-MS* (Biedka et al., 2025) demostró que la fijación covalente del anticuerpo reduce drásticamente la co-elución de inmunoglobulinas y permite recuperar de manera más específica la proteína diana junto con sus complejos asociados. En este sentido, la estrategia implementada aquí no solo evitó interferencias derivadas de fragmentos de anticuerpo en el análisis por MS, sino que también favoreció la identificación confiable de TcCAL1 y de interactores como subunidades de PFD y TcARM. De este modo, la elección metodológica se encuentra alineada con estándares actuales de IP-MS y refuerza la validez de los resultados obtenidos.

Más allá de los candidatos validados, la espectrometría reveló un conjunto de proteínas exclusivas de la fracción inmunoprecipitada con anti-TcCAL1. Estas proteínas no fueron detectadas en los controles (resina con suero pre-inmune) y tampoco se corresponden con los interactores del doble híbrido, lo que sugiere un vecindario molecular más amplio. Entre ellas,

se identifican componentes asociados a: (i) Metabolismo energético y glicosomas, que podrían vincular la unión a Ca^{2+} de TcCAL1 con la regulación metabólica en condiciones de estrés, como Tirosina aminotransferasa (Q4CVI0), Glutamilo carboxipeptidasa (Q4CR09), Glucosa-6-fosfato isomerasa (Q4E2M9); (ii) Citoesqueleto y motilidad flagelar, que refuerzan el posible rol de TcCAL1 en procesos dinámicos de metacicloogénesis y adhesión, como Proteína asociada al citoesqueleto CAP5.5 (Q4DJS7), Quinasa inespecífica de serina/treonina (Q4CSP0); (iii) Proteínas hipotéticas exclusivas de tripanosomátidos, que aún carecen de anotación funcional clara pero podrían representar nodos novedosos en la red de señalización dependiente de calcio.

Aun así, la cuantificación por conteo de espectros (PSMs) tiene limitaciones intrínsecas. Aunque puede aportar una estimación relativa de la abundancia de un péptido o proteína, se trata de un método semi-cuantitativo y dependiente de la eficiencia de ionización y fragmentación en el espectrómetro (Bantscheff et al., 2007). En consecuencia, proteínas altamente abundantes en el proteoma total tienden a estar sobrerrepresentadas, mientras que interactores de baja abundancia pueden pasar inadvertidos. Así, la interpretación de relevancia debe considerar no solo los conteos de PSMs, sino también la consistencia experimental, la especificidad frente a controles y la plausibilidad biológica de las interacciones detectadas.

Finalmente, este trabajo también se propuso abordar la identificación de intreractores para TcCAL1 con una metodología *in vivo*, basado en la técnica de BioID. Para esto, se generaron de los vectores recombinantes pTcINDEX-myc-BirA*-TcCAL1 y control pTcINDEX-myc-BirA-GFP, para expresar las proteínas de fusión BirA*-TcCAL1 y BirA-GFP, respectivamente, en epimastigotes de *T. cruzi*. Estos cultivos se han seleccionado recientemente, y se espera avanzar con la inducción a la expresión de las proteínas de fusión, el tratamiento con biotina y la posterior purificación de los complejos biotinilados por afinidad en columnas de estreptavidina-agarosa. Estas purificaciones se enviarán a analizar por espectrometría de masa para la identificación de las proteínas que se asocian a TcCAL1 y la comparación de los resultados con los obtenidos por Co-IP y Y2H. Además, este abordaje constituye la base para futuros estudios que podrán aplicar la técnica de BioID en *T. cruzi* con el fin de mapear el entorno interactómico de TcCAL1 en condiciones fisiológicas.

El sistema BioID clásico requiere incubaciones prolongadas (~16–24 h), lo que permite identificar interacciones transitorias o débiles. La posibilidad de capturar interacciones transitorias o de baja afinidad mediante el etiquetado covalente con biotina ofrece una ventaja clave frente a métodos clásicos como la co-inmunoprecipitación. Sin embargo, esta ventaja también presenta sus limitaciones, ya que puede ocurrir una biotilación basal o inespecífica, sumado a artefactos producto de la sobreexpresión de las proteínas de fusión (Roux et al., 2012).

Actualmente, la ingeniería genética puso a disposición versiones modificadas de ligasas de biotina, como las enzimas TurboID/miniTurbo. Estas ligasas son más eficientes, ya que pueden realizar la biotilación en minutos o incluso a bajas temperaturas. En contraste, esta actividad basal optimizada puede generar una proporción mayor de falsos positivos, debido al empleo como sustrato de pequeñas concentraciones de biotina endógena, radio algo mayor y, en algunos sistemas, toxicidad/consumo de biotina (Guo et al., 2023). Este resulta en que la versión TurboID puede “sobre-etiquetar” proteínas si no se controlan muy fuertemente los tiempos de incubación o las concentraciones de biotina, especialmente bajo expresión elevada (Guo et al., 2023). En este contexto, la elección de BirA* en este trabajo se fundamenta en una menor promiscuidad de reacción basal a costa de un tiempo de marcado mayor.

Dado que se ha reportado previamente el uso de esta metodología en *T. cruzi* utilizando TurboID (Won et al., 2023), se emplearán esas condiciones como base para la puesta a punto del sistema construido en este trabajo.

Además, dado que se estima que el radio del etiquetado por BirA* es de de ~10 nm, esperamos poder identificar asociaciones específicas, independientemente de su afinidad.

En un organismo con una alta proporción de proteínas de función desconocida, esta tesis aporta datos interesantes que podrían contribuir en un futuro, a dilucidar el rol de TcCAL1 en la homeostasis intercelular de este patógeno, importante para la salud pública.

En conjunto, este trabajo propone un modelo integrador para TcCAL1 como un sensor de Ca²⁺ multifuncional cuyo repertorio de interacciones —particularmente con TcPFD y TcARM— puede modularse por modificaciones postraduccionales, contribuyendo así a la dinámica de

ensamblaje de complejos proteicos y a la adaptación celular de *T. cruzi* frente a cambios del entorno; además, las herramientas generadas sientan las bases para explorar de manera cuantitativa y fisiológica su red de interacción mediante abordajes de proximidad *in vivo*

7. Bibliografía.

Abras, A., Ballart, C., Fernández-Arévalo, A., Pinazo, M.-J., Gascón, J., Muñoz, C., Gállego, M., 2022. Worldwide Control and Management of Chagas Disease in a New Era of Globalization: a Close Look at Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *Clin Microbiol Rev* 35, e00152-21. <https://doi.org/10.1128/cmr.00152-21>

Aicart-Ramos, C., Valero, R. A., & Rodriguez-Crespo, I. (2011). Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808(12), 2981–2994. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.009>

Allouche, D., Parello, J., & Yves-Henri Sanejouand. (1999). Ca²⁺ /Mg²⁺ exchange in parvalbumin and other EF-hand proteins. A theoretical study 1 Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*, 285(2), 857–873. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2329>

Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., Depledge, D. P., Fischer, S., Bindu Gajria, Gao, X., Gardner, M. J., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Hertz-Fowler, C., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., & Kissinger, J. C. (2009). TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_1), D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp851>

Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., & Kuster, B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4), 1017–1031. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>

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

Berná, L., Greif, G., Pita, S., Faral-Tello, P., Díaz-Viraqué, F., Souza, R.D.C.M.D., Vallejo, G.A., Alvarez-Valin, F., Robello, C., 2021. Maxicircle architecture and evolutionary insights

into *Trypanosoma cruzi* complex. *PLoS Negl Trop Dis* 15, e0009719.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009719>

Biedka, S., Yablonska, S., Peng, X., Alkam, D., Hartoyo, M., VanEvery, H., Kass, D. J., Byrum, S. D., Xiao, K., Zhang, Y., Domsic, R. T., Lafyatis, R., Ascherman, D. P., & Minden, J. S. (2025). IP-to-MS: An Unbiased Workflow for Antigen Profiling. *Journal of Proteome Research*, 24(2), 795–812. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00837>

Callejas-Hernández, F., Herreros-Cabello, A., Del Moral-Salmoral, J., Fresno, M., Gironès, N., 2021. The Complete Mitochondrial DNA of *Trypanosoma cruzi*: Maxicircles and Minicircles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 672448. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.672448>

Capozzi, F., Casadei, F., & Luchinat, C. (2006). EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(8), 949–962. <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0163-0>

Caradonna, K. L., & Burleigh, B. A. (2011). Mechanisms of Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Parasitology/Advances in Parasitology*, 33–61. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385895-5.00002-5>

Chávez, S., Urbaniak, M.D., Benz, C., Smircich, P., Garat, B., Sotelo-Silveira, J.R., Duhagon, M.A., 2021a. Extensive Translational Regulation through the Proliferative Transition of *Trypanosoma cruzi* Revealed by Multi-Omics. *mSphere* 6, e00366-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00366-21>

Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(9), 2513–2526. <https://doi.org/10.1074/mcp.m113.031591>

D'Angelo, M.A., Montagna, A.E., Sanguineti, S., Torres, H.N., Flawiá, M.M., 2002. A Novel Calciumstimulated Adenylyl Cyclase from *Trypanosoma cruzi*, Which Interacts with the

Structural Flagellar Protein Paraflagellar Rod. *Journal of Biological Chemistry* 277, 35025–35034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204696200>

Dave, N., Cetiner, U., Arroyo, D., Fonbuena, J., Tiwari, M., Barrera, P., Lander, N., Anishkin, A., Sukharev, S., Jimenez, V., 2021. A novel mechanosensitive channel controls osmoregulation, differentiation, and infectivity in *Trypanosoma cruzi*. *eLife* 10, e67449. <https://doi.org/10.7554/eLife.67449>

De Fuentes-Vicente, J.A., Santos-Hernández, N.G., Ruiz-Castillejos, C., Espinoza-Medinilla, E.E., Flores-Villegas, A.L., De Alba-Alvarado, M., Cabrera-Bravo, M., Moreno-Rodríguez, A., VidalLópez, D.G., 2023. What Do You Need to Know before Studying Chagas Disease? A Beginner's Guide. *TropicalMed* 8, 360. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8070360>

Di Renzo, M. A., Laverrière, M., Schenkman, S., Wehrendt, D. P., Tellez-Iñón, M. T., & Potenza, M. (2016). Characterization of TcCYC6 from *Trypanosoma cruzi*, a gene with homology to mitotic cyclins. *Parasitology International*, 65(3), 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.12.007>

Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M.L., Libisch, M.G., Robello, C., 2023. Genome-wide chromatin interaction map for *Trypanosoma cruzi*. *Nat Microbiol* 8, 2103–2114. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01483-y>

Docampo, R., Moreno, S.N.J., 2011. Acidocalcisomes. *Cell Calcium* 50, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.012>

Ferrer Maria Jose; Wehrendt Diana Patricia; Tellez-Iñon Maria Teresa; Potenza Mariana. (2017). Defining the function of an hypothetical calcium binding protein identified in *Trypanosoma cruzi*. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, Buenos Aires, Argentina.

https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=glifosato&id=30203&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=7822959

Gifford, J., Walsh, M., & Vogel, H. (2007). Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal*, 405(2), 199–221. <https://doi.org/10.1042/bj20070255>

Gómez, E. B., Santori M. I., Sebastián Laría, Engel, J. C., Swindle, J., Eisen, H., Philippe Szankasi, & Téllez-Iñón M. T. (2001). Characterization of the Trypanosoma cruzi Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 113(1), 97–108. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(00\)00382-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(00)00382-0)

Guo, J., Guo, S., Lu, S., Gong, J., Wang, L., Ding, L., Chen, Q., & Liu, W. (2023). The development of proximity labeling technology and its applications in mammals, plants, and microorganisms. *Cell Communication and Signaling*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01310-1>

Guzman, U. H., Martinez-Val, A., Ye, Z., Eugen Damoc, Arrey, T. N., Pashkova, A., Santosh Renuse, Eduard Denisov, Petzoldt, J., Peterson, A. C., Florian Harking, Ole Østergaard, Rasmus Rydbirk, Aznar, S., Stewart, H., Xuan, Y., Hermanson, D., Horning, S., Hock, C., & Makarov, A. (2024). Ultra-fast label-free quantification and comprehensive proteome coverage with narrow-window data-independent acquisition. *Nature Biotechnology*, 42(12), 1855–1866. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-02099-7>

Hamedi, A., Botelho, L., Britto, C., Fragoso, S.P., Umaki, A.C.S., Goldenberg, S., Bottu, G., Salmon, D., 2015. In vitro metacyclogenesis of Trypanosoma cruzi induced by starvation correlates with a transient adenylyl cyclase stimulation as well as with a constitutive upregulation of adenylyl cyclase expression. *Molecular and Biochemical Parasitology* 200, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.04.002>

Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R., Michels, P.A., 2003. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 11. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-2-11>

Hashimoto, M., Doi, M., Kurebayashi, N., Furukawa, K., Hirawake-Mogi, H., Ohmiya, Y., Sakurai, T., Mita, T., Mikoshiba, K., Nara, T., 2016. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor determines intracellular Ca²⁺ concentration in Trypanosoma cruzi throughout its life cycle. *FEBS Open Bio* 6, 1178–1185. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12126>

Hatzfeld, M. (1998). The Armadillo Family of Structural Proteins. *International Review of Cytology*, 179–224. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61054-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61054-2)

Hertz-Fowler, C., Ersfeld, K., & Gull, K. (2001). CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 116(1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00296-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00296-1)

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., & Back, T. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Kumar, V., Behl, A., Shoaib, R., Abid, M., Maxim Shevtsov, & Singh, S. (2020). Comparative structural insight into prefoldin subunits of archaea and eukaryotes with special emphasis on unexplored prefoldin of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(8), 3804–3818. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1850527>

Lakowicz, J. R., Szmajcinski, H., Nowaczyk, K., & Johnson, M. L. (1992). Fluorescence lifetime imaging of calcium using Quin-2. *Cell Calcium*, 13(3), 131–147. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(92\)90041-p](https://doi.org/10.1016/0143-4160(92)90041-p)

Lammel, E.M., Barbieri, M.A., Wilkowsky, S.E., Bertini, F., Isola, E.L.D., 1996. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of Intracellular Calcium in Multiplication and Differentiation. *Experimental Parasitology* 83, 240–249. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0070>

Lander, N., Chiurillo, M.A., Docampo, R., 2021. Signaling pathways involved in environmental sensing in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* 115, 819–828. <https://doi.org/10.1111/mmi.14621>

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

Liang, J., Xia, L., Oyang, L., Lin, J., Tan, S., Yi, P., Han, Y., Luo, X., Wang, H., Tang, L., Pan, Q., Tian, Y., Rao, S., Su, M., Shi, Y., Cao, D., Zhou, Y., & Liao, Q. (2020). The functions and

mechanisms of prefoldin complex and prefoldin-subunits. *Cell & Bioscience*, 10(1).
<https://doi.org/10.1186/s13578-020-00446-8>

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

Kaufer, A., Stark, D., & Ellis, J. (2019). Evolutionary Insight into the Trypanosomatidae Using Alignment-Free Phylogenomics of the Kinetoplast. *Pathogens*, 8(3), 157–157.
<https://doi.org/10.3390/pathogens8030157>

Kruger, N. J. (2002). The Bradford method for protein quantitation. En J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (2nd ed., pp. 15–21). Humana Press.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:15>

Maeda, F. Y., Cortez, C., & Yoshida, N. (2012). Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00361>

Martin-Benito, J. (2002). Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. *The EMBO Journal*, 21(23), 6377–6386.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdf640>

Martins, C., J.L. Reis-Cunha, Silva, M. N., Pereira, E. G., Jr, G. J. P., D.C. Bartholomeu, & Zingales, B. (2011). Identification of genes encoding hypothetical proteins in open-reading frame expressed sequence tags from mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1589–1630. <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1140>

Medina-Rincón, G.J., Gallo-Bernal, S., Jiménez, P.A., Cruz-Saavedra, L., Ramírez, J.D., Rodríguez, M.J., Medina-Mur, R., Díaz-Nassif, G., Valderrama-Achury, M.D., Medina, H.M., 2021. Molecular and Clinical Aspects of Chronic Manifestations in Chagas Disease: A State-of-the-Art Review. *Pathogens* 10, 1493. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111493>

Michels, P.A.M., Gualdrón-López, M., 2022. Biogenesis and metabolic homeostasis of trypanosomatid glycosomes: New insights and new questions. *J Eukaryotic Microbiology* 69, e12897. <https://doi.org/10.1111/jeu.12897>

Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>

Nair, A., Kubatzky, K. F., & Saha, B. (2021). Ras Isoforms from Lab Benches to Lives—What Are We Missing and How Far Are We? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6508–6508. <https://doi.org/10.3390/ijms22126508>

Níttolo, A. G., Chidichimo, A. M., Benacerraf, A. L., Cardozo, T., Corso, M. C., Tekiel, V., De Gaudenzi, J. G., & Levy, G. V. (2025). TcSR62, an RNA-binding protein, as a new potential target for anti-trypanocidal agents. *Frontiers in Microbiology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1539778>

Onofre, T. S., Rodrigues, J. P. F., Shio, M. T., Macedo, S., Juliano, M. A., & Yoshida, N. (2021). Interaction of *Trypanosoma cruzi* Gp82 With Host Cell LAMP2 Induces Protein Kinase C Activation and Promotes Invasion. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.627888>

Ossowski, M. S., Gallardo, J. P., Niborski, L. L., Rodríguez-Durán, J., Lapadula, W. J., Ayub, M. J., Raúl Chadi, Hernandez, Y., Fernandez, M. L., Potenza, M., & Gómez, K. A. (2024). Characterization of Novel *Trypanosoma cruzi*-Specific Antigen with Potential Use in the Diagnosis of Chagas Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1202–1202. <https://doi.org/10.3390/ijms25021202>

Okuda, K., Esteva, M., Segura, E.L., Bijovsky, A.T., 1999. The Cytostome of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Is Associated with the Flagellar Complex. *Experimental Parasitology* 92, 223–231. <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4419>

Passos, L. S. A., Koh, C. C., Magalhães, L. M. D., Nunes, M. do C. P., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2021). Distinct CD4–CD8– (Double-Negative) Memory T-Cell Subpopulations Are Associated With Indeterminate and Cardiac Clinical Forms of Chagas Disease. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761795>

Rassi, A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *The Lancet* 375, 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

Rohloff, P., Montalvetti, A., Docampo, R., 2004. Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex Are Involved in Osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 52270–52281. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410372200>

Rodríguez Durán, Jessica Jenireth. (2024). Caracterización funcional de TcCAL1, una nueva proteína con dominios de unión a calcio identificada en *Trypanosoma cruzi*. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n7498_RodriguezDuran

Rodríguez Durán, J., Gallardo, J. P., Dirney, C., Gómez, K. A., & Potenza, M. (2022). The Kinetoplastid-Specific Protein TcCAL1 Plays Different Roles During In Vitro Differentiation and Host-Cell Invasion in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.901880>

Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 196(6), 801–810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>

Rohloff, P., y Docampo, R. (2008). A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 118(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.04.013>

Rohloff, P., Rodrigues, C.O., Docampo, R., 2003. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126, 219–230. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00277-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00277-3)

Sant’Anna, C., De Souza, W., Cunha-e-Silva, N., 2004. Biogenesis of the Reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal* 10, 637–646. <https://doi.org/10.1017/S1431927604040863>

Santos Júnior, A. de C. M. dos, Melo, R. M., Ferreira, B. V. G., Pontes, A. H., Lima, C. M. R. de, Fontes, W., Sousa, M. V. de, Lima, B. D. de, & Ricart, C. A. O. (2021). Quantitative proteomics and phosphoproteomics of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell cycle. *Biochimica*

et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 1869(5), 140619. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140619>

Schmidt, J., Kleffmann, T., Schaub, G.A., 1998. Hydrophobic attachment of Trypanosoma cruzi to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug Triatoma infestans. Parasitology Research 84, 527–536. <https://doi.org/10.1007/s004360050443>

Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). PyMOL. Retrieved from <http://www.pymol.org/pymol>

Siegert, R., Leroux, M. R., Scheufler, C., Hartl, F. Ulrich., & Ismail Moarefi. (2000). Structure of the Molecular Chaperone Prefoldin. Cell, 103(4), 621–632. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00165-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00165-3)

Simons, Cyrena Torrey. (2004). Structural and functional characterization of the chaperone prefoldin. New York University. <https://www.proquest.com/openview/c4926dcb92fbc9764c219505b45e9406/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>

Sosa-Estani, S., Segura, E.L., 2015. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem - A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110, 289–298. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140408>

Souza, W., 2002. Basic Cell Biology of Trypanosoma cruzi. CPD 8, 269–285. <https://doi.org/10.2174/1381612023396276>

Subramanian, K., Dietrich, L. E. P., Hou, H., LaGrassa, T. J., Meiringer, C. T. A., & Ungermann, C. (2006). Palmitoylation determines the function of Vac8 at the yeast vacuole. Journal of Cell Science, 119(12), 2477–2485. <https://doi.org/10.1242/jcs.02972>

Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Katerina Nastou, Farrokh Mehryary, Radja Hachilif, Gable, A. L., Fang, T., Nadezhda T Doncheva, Sampo Pyysalo, Bork, P., Jensen, L., & von Mering, C. (2022). The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. Nucleic Acids Research, 51(D1), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>

Tahmaz I, Somayeh Shahmoradi Ghahe, Stasiak, M., Liput, K. P., Jonak, K., & Topf, U. (2023). Prefoldin 2 contributes to mitochondrial morphology and function. *BMC Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01695-y>

Teixeira, D.E., Benchimol, M., Crepaldi, P.H., De Souza, W., 2012. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1749. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>

Veit, M., Laage, R., Dietrich, L., Wang, L., & Ungermann, C. (2001). Vac8p release from the SNARE complex and its palmitoylation are coupled and essential for vacuole fusion. *The EMBO Journal*, 20(12), 3145–3155. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3145>

Vercesi, Anibal E., Bernardes, C. F., Hoffmann, M. E., F.R. Gadelha, & Docampo, R. (1991). Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *Journal of Biological Chemistry*, 266(22), 14431–14434. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)98703-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)98703-x)

Vidal, J.C., Souza, W.D., 2017. Morphological and Functional Aspects of Cytoskeleton of Trypanosomatids, in: Jimenez-Lopez, J.C. (Ed.), *Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66859>

Vidal, J.C., Alcantara, C.D.L., De Souza, W., Cunha-e-Silva, N.L., 2016. Loss of the cytostomecytopharynx and endocytic ability are late events in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Journal of Structural Biology* 196, 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.07.018>

Wan, J., Roth, A. F., Bailey, A. O., & Davis, N. G. (2007). Palmitoylated proteins: purification and identification. *Nature Protocols*, 2(7), 1573–1584. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.225>

Wingard, J. N., Ladner, J., Vanarotti, M., Fisher, A. J., Robinson, H., Buchanan, K. T., Engman, D. M., & Ames, J. B. (2008). Structural insights into membrane targeting by the flagellar calcium-binding protein (FCaBP), a myristoylated and palmitoylated calcium sensor in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(34), 23388–23396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803178200>

Winters, R., Nguyen, T., & Waseem, M. (2025, March 27). Chagas Disease. Nih.gov; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459272/>

Won, M. M., Baublis, A., & Burleigh, B. A. (2023). Proximity-Dependent Biotinylation and Identification of Flagellar Proteins in *Trypanosoma cruzi*. *MSphere*, 8(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00088-23>

Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 78(1), 87–111. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652006000100010>

Zhang, C., Freddolino, P. L., & Zhang, Y. (2017). COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein–protein interaction information. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W291–W299. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx366>.

8. Anexo.

8.1. Medios y soluciones

Solución P1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 95 mM Glucosa pH 8.0.

Solución P2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS.

Solución P3: 1,5 M acetato de potasio, pH 5.5.

Buffer Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE): 40 mM Tris base, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA.

Reactivo de Bradford: 100 mM Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % v/v metanol, 20 % v/v ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85 %, completado con agua ultrapura (H_2O mQ).

Buffer de lisis/lavado: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % v/v NP-40, 5 % v/v glicerol, pH 7.4, con inhibidor de proteasas 10 × agregado en el momento previo al uso.

Acrilamida/Bis: solución madre con 4 M acrilamida y 0,05 M N,N'-bis-metilen-acrilamida.

Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8: Preparado con Tris base y ajustado con HCl.

Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8: Preparado con Tris base y ajustado con HCl.

Buffer de corrida para proteínas: 25 mM Tris-Base, 192 mM glicina y 0,1 % (p/v) SDS.

Colorante Coomassie Blue coloidal: 2 % (p/v) Coomassie G-250, 0,4 M sulfato de amonio y 0,2 M ácido ortofosfórico.

Solución de Ponceau S: 0,1 % p/v Ponceau S, 5 % v/v ácido acético glacial, completado con agua ultrapura (H_2O mQ) hasta el volumen final.

Buffer Fosfato Salino 1X (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 .

Medio Luria-Bertani (LB): 0.1% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 1% (p/v) NaCl, pH 7.

Medio Luria-Bertani agar (LB-agar): medio LB con el agregado de agar, 15g/L pH 7.

Infusión de Hígado-Triptosa (LIT): 0.4% (p/v) NaCl, 0.5% (p/v) bacto triptosa, 0.5% (p/v) infusión de hígado, 0.4% (p/v) KCl, 0.8% (p/v) Na₂HPO₄, 20 mM glucosa, 20 μM hemina, 10 U/mL penicilina and 10 mg/mL estreptomicina.

Infusión de Cerebro y Corazon-Triptosa (BHT): 0.5% (p/v) bacto triptosa, 0.5% (p/v) infusión de cerebro y corazón, 20 μM hemina, 10 U/mL penicilina y 10 mg/mL estreptomicina.

8.2. Anticuerpos.

Para el armado de la columna de co-inmunoprecipitación se utilizó un anticuerpo policlonal anti-TcCAL1 producido en ratón en nuestro laboratorio y/o un suero pre-preimmune como control.

Para la inmunodetección se utilizó el anticuerpo policlonal anti-TcCAL1, y una solución de anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa (HRP) producido en cabra (KPLaboratories, Estados Unidos), como anticuerpos primario y secundario, respectivamente.

8.3. Oligonucleótidos y vectores.

En este trabajo se utilizaron los siguientes plásmidos:

pLew100_myc_BirA*: (cedido por el Dr. Brook Morriswood, Universidad de Wurzburg, Alemania), que contiene las secuencias necesarias para su utilización en experimentos de biotinylation dependiente de proximidad (Morriswood et al., 2012), (Fig. 22).

pTcINDEX: vector inducible por el agregado de tetraciclina, diseñado para expresar proteínas recombinantes en *T. cruzi* (Taylor y Kelly, 2006), (Fig. 23).

pTcINDEX_GFP: vector de inducible por el agregado de tetraciclina, diseñado para expresar la proteína reportera en *T. cruzi* (Taylor y Kelly, 2006), (Fig. 24).

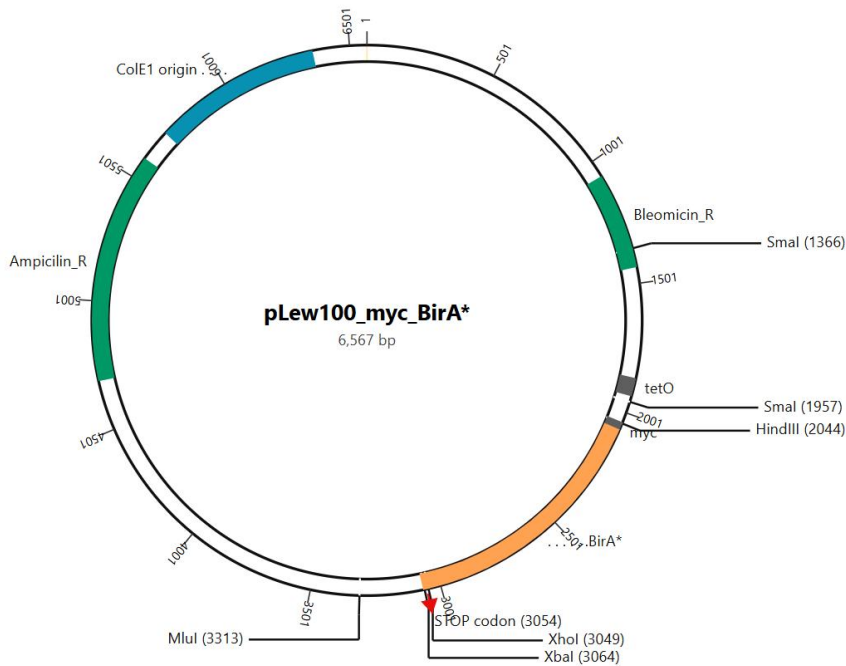


Figura 22: Mapa esquemático del plásmido pLew100_myc_BirA* (6.567 bp). El plásmido posee un origen de replicación ColE1 para propagación en *E. coli* y genes de resistencia a ampicilina (Ampicillin_R) y bleomicina (Bleomycin_R) para la selección en bacterias y tripanosomátidos, respectivamente. El esquema también muestra sitios de enzimas de restricción utilizadas en la estrategia de clonación.

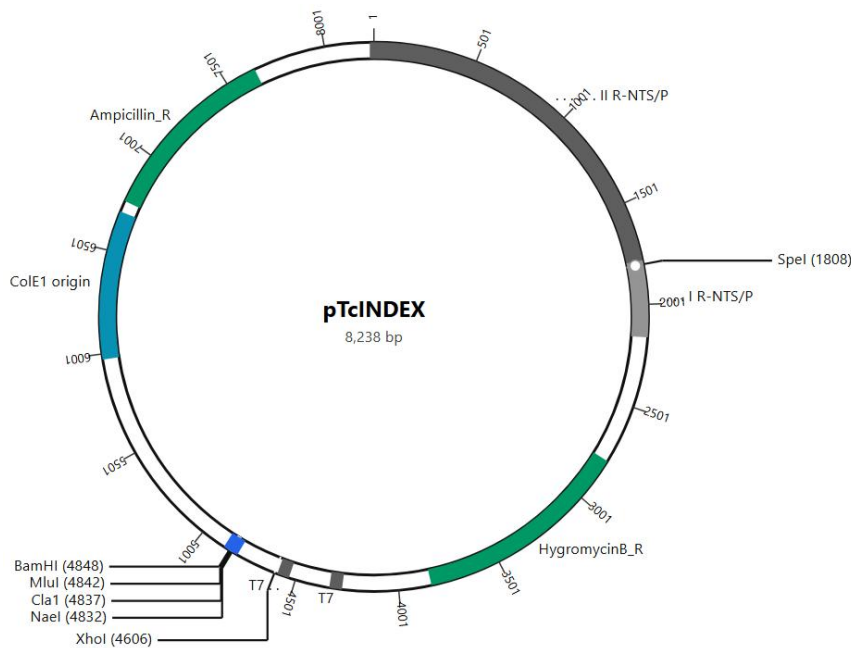


Figura 23: Mapa esquemático del plásmido pTcINDEX (8.238 bp). Este vector de expresión inducible para *T. cruzi* contiene un origen de replicación ColE1 que permite su propagación en *E. coli*, así como genes de resistencia a ampicilina (Ampicillin_R) y higromicina B (HygromycinB_R) para la selección en bacterias y parásitos, respectivamente. En su región central incorpora las secuencias reguladoras del promotor ribosomal rRNA intergenic non-transcribed spacer/promoter (I y II R-NTS/P).

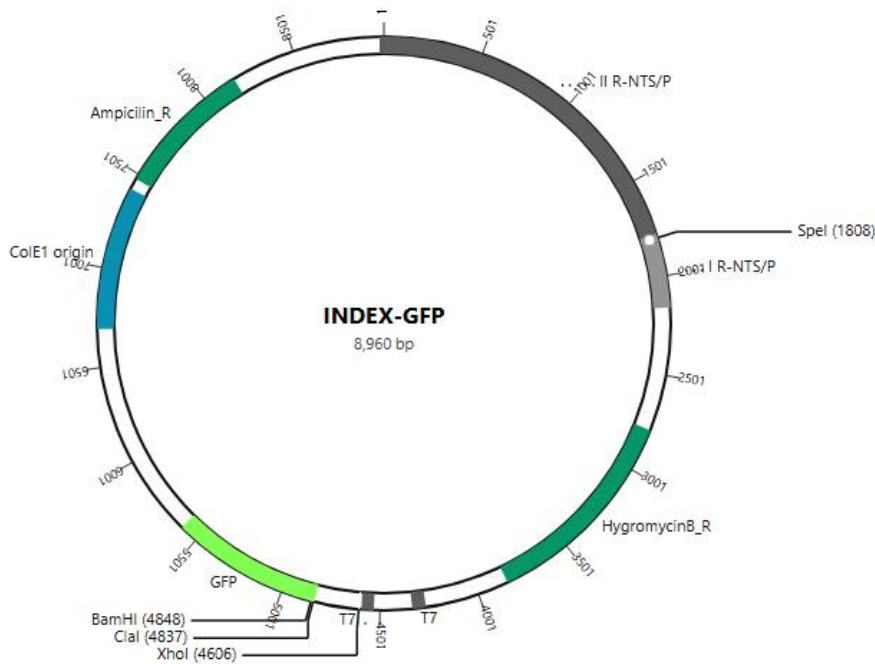


Figura 24: Mapa esquemático del plásmido pTcINDEX_GFP (8.960 bp). El plásmido Es derivado del plásmido pTcINDEX, con el agregado de la secuencia codificante para la proteína GFP en el sitio de clonado múltiple del mismo.

8.3.1. Oligonucleótidos

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

Oligonucleótido	Secuencia	Enzima de restricción
For-TcCAL1	5'-GCGCTCGAGATGCAACGCAGTCTA-3'	XhoI
TcCAL1-Rev	5'-GCGTCTAGATTATCGCTGAGCAAATTCAG-3'	XbaI
For-BirA	5'- GCATCGATATGGAACAAAACTCATCTC -3'	ClaI
BirA-Rev	5'- CGGGATCCATCTCGAGCTTCTC -3'	BamHI

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos