



**UNR** Universidad  
Nacional de Rosario

Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas de  
la Universidad Nacional de Rosario

*“Evaluación de una proteína de  
Trypanosoma cruzi como posible marcador  
diagnóstico”*

**María Azul de Hernández**

TESINA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

Directoras: Dra. Pamela Cribb y Dra. Silvina Villar

Rosario, Argentina

2021

## Contenido

Agradecimientos

Abreviaturas y anglicismos

Resumen

1	Introducción .....	5
1.1	Trypanosoma cruzi .....	5
1.1.1	Morfología .....	5
1.1.2	Ciclo de vida .....	8
1.1.3	Diversidad genética de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
1.2	Enfermedad de Chagas .....	11
1.2.1	Epidemiología.....	11
1.2.2	Patogénesis y manifestaciones clínicas.....	12
1.2.3	Respuesta inmunológica frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
1.2.4	Diagnóstico .....	17
1.2.5	Tratamiento.....	18
1.3	Proteínas High Mobility Group.....	19
1.3.1	Proteínas High Mobility Group B (HMGB).....	20
1.3.2	Proteína HMGB de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcHMGB).....	22
2	Objetivos .....	25
3	Materiales y Métodos .....	26
3.1	Herramientas Bioinformáticas .....	26
3.2	Manipulación de animales y muestras histopatológicas .....	27
3.2.1	Animales .....	27
3.2.2	Esquema de infección .....	27
3.2.3	Parasitemia, sobrevida y peso del bazo .....	29
3.2.4	Histopatología .....	30
3.2.5	Análisis estadístico .....	30
3.3	Manipulación de cepas bacterianas.....	30
3.3.1	Cepas bacterianas de <i>E. coli</i> .....	30
3.3.2	Medio de cultivo para cultivos bacterianos .....	31
3.3.3	Crecimiento bacteriano.....	31
3.4	Plásmidos .....	31
3.5	Manipulación de cultivos de células Raw.....	32
3.5.1	Cultivos celulares de células Raw.....	32

3.6	Manipulación de proteínas .....	33
3.6.1	Ensayos de inducción de la expresión de proteínas recombinantes en cultivos de <i>E. coli</i> BL21.....	33
3.6.2	Purificación en condiciones nativas de TcHMGB como fusión a Histidinas.....	33
3.6.3	Concentración de proteínas purificadas .....	34
3.6.4	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	34
3.7	Detección de proteínas utilizando anticuerpos específicos.....	35
3.7.1	Western Blot .....	35
4	Resultados y Discusión .....	37
4.1	Análisis Bioinformático.....	37
4.1.1	TriTrypDB.....	37
4.1.2	TcHMGB.....	40
4.1.3	Localización genómica de TcHMGB.....	40
4.1.4	TcHMGB se expresa diferencialmente durante el ciclo de vida del parásito.....	41
4.1.5	La proteína TcHMGB presenta dos dominios “HMG box” y un dominio “DEK-C terminal”	46
4.1.6	TcHMGB: las modificaciones postraduccionales podrían afectar su localización y función	50
4.2	Modelo de infección murino experimental de Chagas con la cepa Dm28c de <i>T. cruzi</i>	55
4.2.1	La cepa Dm28c no resultó letal ni generó alteraciones físicas considerables en ratones BALB/c.....	55
4.2.2	La infección produjo un aumento en el tamaño del bazo .....	58
4.2.3	La infección parasitaria generó miocarditis aguda durante la fase aguda y luego disminuyó considerablemente.....	59
4.3	Evaluación de la especificidad de los anticuerpos anti-mHMGB1 .....	61
4.3.1	La proteína del parásito no es reconocida por los anticuerpos anti-mHMGB1 de mamífero	61
5	Conclusiones.....	64
	ANEXO.....	66
6	Bibliografía .....	67

# Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras Pamela Cribb y Silvina Villar por enseñarme e instruirme con tanta paciencia y dedicación en esta última etapa de mi carrera, e impulsarme a seguir aprendiendo y formándome. Disfrute mucho de trabajar en equipo con ustedes.

A todos los integrantes del laboratorio de Biología y Bioquímica de *T. cruzi* por hacer del laboratorio un lugar tan grato para trabajar y brindarme ayuda siempre que la necesite, especialmente al Dr. Esteban Serra, a la Dra. Virginia Perdomo y a Elvio Rodríguez por su ayuda desinteresada y buena predisposición.

A mis amigos de la Facultad, Virginia, Sol, Camila, Paloma, Gonzalo, Catalina, Melina, Agustina y David, por todo lo compartido en estos años, hicieron de mi paso por la FbioyF una experiencia hermosa y muy feliz. A Cielo, que de no haberte encontrado esta etapa final hubiese sido imposible.

A mis amigas del sur, María, Sofía, Ana, Carla y Noelia por estar siempre a pesar de las distancias y brindarme tantas risas y recuerdos imborrables en cada reencuentro. A las que me regaló mi paso por Rosario, Mariana, Agustina y Agustina por acompañarme siempre.

A Alejandro, por creer más en mí de lo que yo lo hago y recordarme que siempre puedo más.

A mis padres, por su apoyo y amor incondicional, por no dudar ni un segundo de mí y darme la libertad de elegir lo que me haga feliz. A mis hermanos, Laura, Carlos, Lautaro y Jorge, por siempre cuidarme. Sin ustedes nada de esto sería posible y espero poder devolverles al menos un poco de todo el amor y felicidad que me dan.

## Abreviaturas y Anglicismos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADNk	ADN del kinetoplasto
APCs	Células presentadoras de antígeno
C-terminal	carboxilo terminal
CDs	Células dendríticas
Cf	Concentración final
c.s.p.	cantidad suficiente para
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTUs	Discreet Typing Units (Unidades discretas de tipificación)
días pi	Días postinfección
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g/L	gramos por litro
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LPS	Lipopolisacárido
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
nt	nucleótidos
N-terminal	Amino terminal
NLS	Nuclear Localization Signal (Señal de localización nuclear)

ng/ml	nanogramo por mililitro
mg/kg	miligramo por kilogramo
PAMPs	Pathogen Associated Molecular patterns
pb	pares de bases
PBS	Phosphate Buffered saline (Tampón salino de fosfato)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pi	Postinfección
PRRs	Pattern Recognition receptors (receptores de reconocimiento de patrones)
SFB	Suero Fetal Bovino
TcHMGB	High Mobility Group B de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> .
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocito T cooperador
Th0	Linfocitos T cooperadores vírgenes
Th1	Linfocitos T cooperadores de tipo 1
Th2	Linfocitos T cooperadores de tipo 2
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
tet	Tetraciclina
%v/v	porcentaje volumen en volumen
%p/v	porcentaje peso en volumen
mA	miliAmperios
mM	milimolar

ON	Over Night (durante toda la noche)
rpm	revoluciones por minuto
µg/ml	microgramo por mililitro

## Resumen

La proteína High Mobility Group B de *Trypanosoma cruzi* (TcHMGB), al igual que otros miembros de la familia HMGB, participa en importantes procesos nucleares por su capacidad de alterar la estructura de la cromatina. Más allá de sus funciones nucleares, en mamíferos, la proteína HMGB1 (mHMGB1) puede ser secretada al medio extracelular bajo condiciones de estrés celular y actuar como “patrón molecular asociado a daño” (DAMP) mediando procesos inflamatorios. Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, observamos que TcHMGB es capaz de inducir una respuesta inflamatoria y es detectada en cortes de tejido de un modelo de infección murino con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tanto en células infectadas como en la región extracelular, lo que sugiere que TcHMGB sería secretada durante la infección. A partir de estos antecedentes, decidimos evaluar su potencialidad como marcador de la infección y su posible aplicación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En primer lugar, se realizó un análisis bioinformático de distintos aspectos del gen y de la secuencia proteica de TcHMGB utilizando la base de datos TritypDB y diferentes programas. Se recopiló así, información valiosa acerca de su localización genómica, los niveles de expresión durante el ciclo de vida del parásito y arquitectura de dominios conservados entre sus ortólogas. Con el uso de predictores, determinamos que la proteína TcHMGB posee sitios conservados que podrían sufrir modificaciones postraduccionales (MPTs) afectando su localización celular, de manera análoga a lo observado en su ortóloga de mamíferos (mHMGB1). Con el fin de estudiar el comportamiento de TcHMGB y mHMGB1 durante una infección *in vivo*, en una primera etapa, caracterizamos un modelo de infección animal con la cepa Dm28c de *T. cruzi*. Este modelo no resultó letal para los animales y éstos presentaron un curso de infección con parasitemias elevadas y afección cardíaca y esplénica, los cuales evolucionaron favorablemente tras superar el pico de parasitemia. Por último, estudiamos la especificidad de anticuerpos comerciales anti-mHMGB1 y se determinó que no reconocen inespecíficamente a la proteína del parásito, por lo que serán útiles en ensayos futuros para el reconocimiento de mHMGB1 en las muestras sin interferencias generadas por TcHMGB.

# 1 Introducción

## 1.1 *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un protozooario flagelado parasitario, agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanomiasis americana. Junto a los parásitos causantes de la tripanomiasis africana y la leishmaniasis pertenecen al filo Euglenozoa, que incluye a organismos unicelulares flagelados. Dentro este filo, se encuentran agrupados bajo la clase Kinetoplastidae, ya que contienen una estructura definida de ADN mitocondrial denominado kinetoplasto. La familia Trypanosomatidae incluye a diversos organismos monoflagelados de importancia clínica, principalmente del género *Leishmania* (que provoca leishmaniasis) y *Trypanosoma*. Los miembros del género *Trypanosoma* se subdividen en dos secciones: Stercoraria y Salivaria. Los organismos de tipo Stercoraria residen en el intestino del insecto vector y son transmitidos por las heces como *T. cruzi*, los Salivaria se ubican en las glándulas salivares y son transmitidos a través de la saliva. Estos últimos incluyen a *Trypanosoma brucei*, causante de la tripanosomiasis africana (Altamura, 2020).

### 1.1.1 Morfología

*Trypanosoma cruzi* es un organismo unicelular que presenta ciertas estructuras características que lo diferencian de otros eucariotas (Fig. 1). En primer lugar, su superficie celular contiene dos elementos: la membrana plasmática y por debajo de ésta, una capa formada por microtúbulos subpeliculares, en conjunto le otorgan rigidez y resistencia a la célula. Los microtúbulos subpeliculares se ubican a lo largo del parásito, espaciados regularmente, excepto en la zona del bolsillo flagelar, una invaginación de la membrana de la cual emerge el flagelo. El flagelo posee una estructura similar a cilios y flagelos de otros eucariotas: un axonema con un patrón de microtúbulos 9+2. Su longitud varía según el estadio de desarrollo del parásito y se encuentra asociado a la membrana a través de un complejo de filamentos denominado “varilla paraflagelar”. Posee una única mitocondria ramificada que se distribuye en el citoplasma. Dentro de la mitocondria se halla una estructura definida denominada kinetoplasto, compuesto por un conjunto de

mini y maxi círculos de ADN mitocondrial muy compacto, que representan un 25% del ADN total del parásito. La posición del kinetoplasto siempre se encuentra asociada a la del cuerpo basal del flagelo. El núcleo celular mide unos 2,5  $\mu\text{m}$  y presenta una estructura similar al de otros eucariotas. Por otro lado, los tripanosomas presentan otras organelas particulares como el glicosoma (derivado de peroxisomas, contiene enzimas involucradas en la vía glucolítica), los acidocalcisomas y los reservosomas (de Souza, 2009).

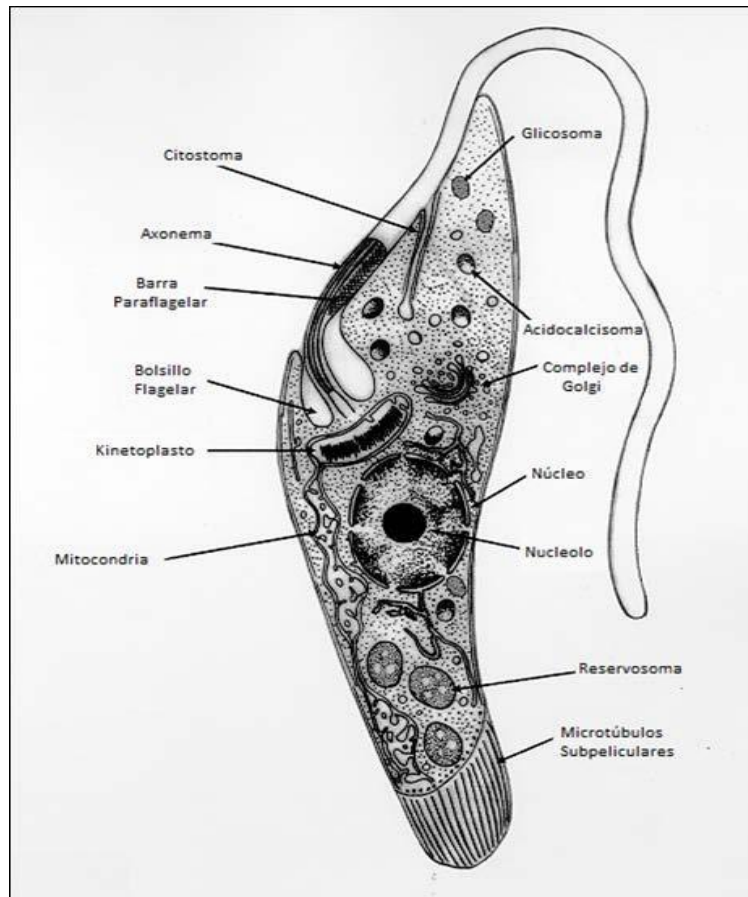


Figura 1. Morfología del parásito *T. cruzi*. Adaptado de: (de Souza, 1999)

Durante los distintos estadios del ciclo de vida, *T. cruzi* presenta tres morfologías principales (Fig. 2):

- Amastigotes: forma redondeada (2-4  $\mu\text{m}$ ), con el kinetoplasto en forma de barra o bastón en la región anterior del núcleo y el flagelo corto (no visible al microscopio óptico) que apenas emerge de la bolsa flagelar. Esta forma replicativa es intracelular, se halla en el interior de las células de hospedadores mamíferos infectados, y se puede obtener por infección de células en cultivo.

- Epimastigotes: forma fusiforme de 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud con el kinetoplasto en forma de barra, en posición posterior el cuerpo basal y anterior al núcleo. Es la forma replicativa en el insecto. Se encuentran en el intestino del vector invertebrado y en la fase logarítmica de crecimiento de cultivos axénicos. También se han descrito formas similares en las células del vertebrado, en un estadio intermedio hacia el final del ciclo intracelular, cuando los amastigotes se transforman en tripomastigotes.
- Tripomastigotes: poseen un largo de 25  $\mu\text{m}$ . Como en los epimastigotes, el flagelo emerge del lateral del cuerpo del parásito. El núcleo es elongado y se encuentra en la posición central de la célula. El kinetoplasto se ubica en forma posterior al núcleo y anterior al cuerpo basal. Se encuentran en células de tejido y sangre del hospedador vertebrado y en la región posterior del intestino, en las heces y orina del hospedador invertebrado. En cultivos axénicos, se pueden observar en la fase estacionaria de crecimiento y en la fase líquida de cultivos bifásicos. No se dividen, y son las formas infectantes tanto para vertebrados como para invertebrados (de Souza, 2002).

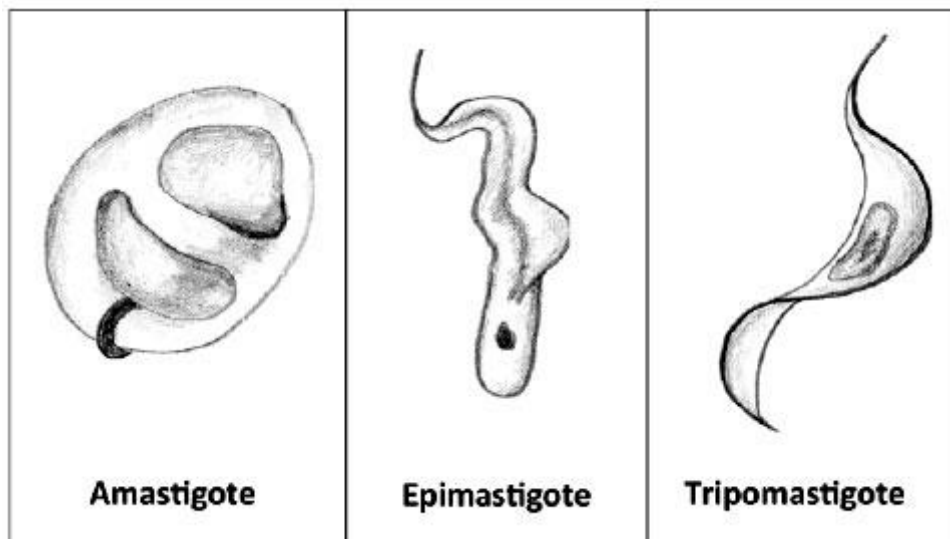


Figura 2. Estadios de vida de *T. cruzi*. Adaptado de (Toso, Vial, & Galanti, 2011)

### 1.1.2 Ciclo de vida

*Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo de vida complejo, con varios estadios de desarrollo que transcurren entre un hospedador vertebrado y uno invertebrado. Los hospedadores invertebrados son insectos hematófagos Hemíptera y Reduvidae como *Rhodinus prolixus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, entre otros. Cuando uno de estos insectos se alimenta succionando sangre de un vertebrado como el ser humano y otros mamíferos, si el hospedador vertebrado se encontraba infectado con el parásito, la sangre ingerida por el invertebrado contendrá tripomastigotes, que al llegar al estómago del insecto se transformarán en epimastigotes y en algunas formas redondeadas. En el intestino, los epimastigotes se dividirán repetidamente por fisión binaria y se unirán a las células intestinales a través de los hemidesmosomas. Una cierta proporción de estos epimastigotes, en el recto, se transformarán en tripomastigotes metacíclicos que serán eliminados con las heces y orina, y tendrán la capacidad de infectar al hospedador vertebrado.

Los tripomastigotes eliminados en las heces y orina del invertebrado podrán penetrar en las células del vertebrado, donde se diferencian a amastigotes. Dentro de la célula, los amastigotes se dividirán repetidamente por fisión binaria y luego, se transformarán en tripomastigotes que serán liberados al medio extracelular. Los tripomastigotes migrarán a través el torrente sanguíneo y alcanzarán otras células para iniciar otro ciclo de infección (de Souza, 2002).

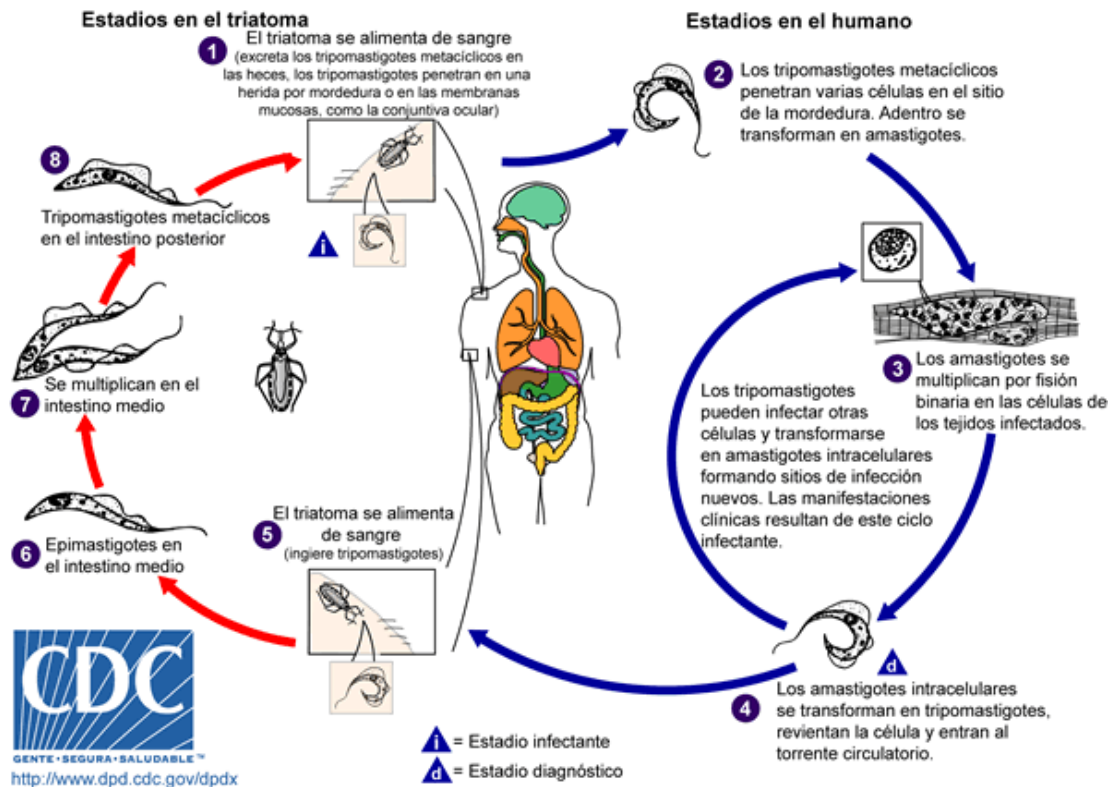


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Adaptada de (CDC, 2019)

### 1.1.3 Diversidad genética de *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* presenta una gran diversidad genética y fenotípica intraespecífica. En la actualidad, *T. cruzi* se divide en 7 unidades discretas de tipificación (DTUs, por sus siglas en inglés) TcI-TcVI y Tbat, las cuales presentan diferencias sustanciales en sus características epidemiológicas, biológicas y clínicas, como su virulencia y la sensibilidad a drogas antiparasitarias (Zingales, 2018).

El genoma de *T. cruzi* presenta grandes diferencias entre cepas, en cuanto a su contenido de ADN, tanto nuclear como kinetoplástico, y su tamaño total (40% y 48%, respectivamente), lo que indicaría una gran plasticidad del genoma potencialmente implicado en la generación de diversidad genotípica y fenotípica (Dvorak, 1982) (Lewis, 2009). La evidencia actual desafía al paradigma tradicional del modelo de evolución clonal en *T. cruzi* e indica que existirían otros mecanismos que contribuirían a la estructura poblacional actual y a la evolución de los distintos subgrupos de *T. cruzi* (Zingales, 2018). Los mecanismos de evolución identificados son la clonalidad, hibridación y el intercambio génico convencional y no convencional. Las relaciones evolutivas entre las DTUs no se

han elucidado completamente y su determinación depende del número y naturaleza de genes analizados. La técnica definida como “gold-standard” para determinar las relaciones evolutivas entre DTUs es la Tipificación multilocus de secuencias (MLST, por sus siglas en inglés) (Enright & Spratt, 1999). Se ha llegado a un consenso de que TcI y TcII son líneas puras que han evolucionado por separado de un ancestro común hace aproximadamente 1-3 millones de años, y que las demás DTUs se generaron a partir de distintos eventos de hibridación (Sturm, 2003).

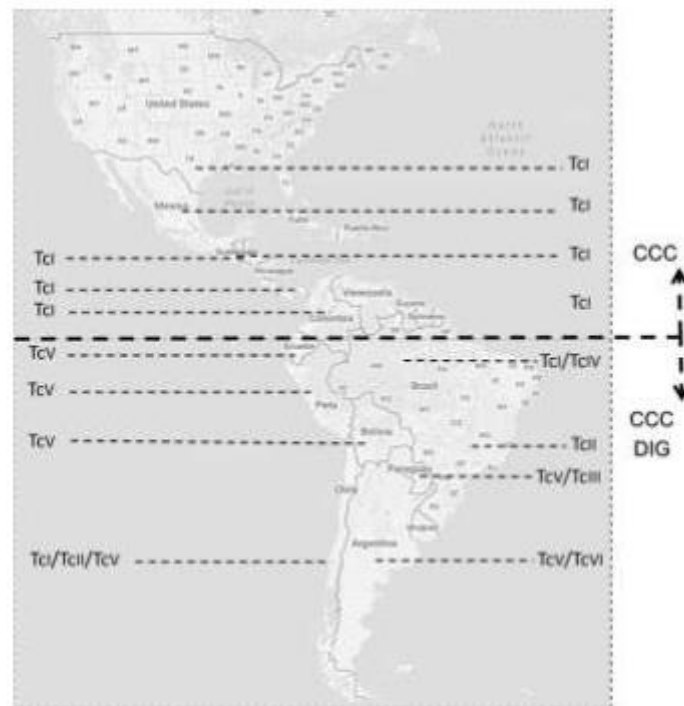


Figura 4. Distribución geográfica de DTUs y manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes con enfermedad de Chagas. Adaptada de: (Zingales, 2018)

La complejidad de *T. cruzi* respecto a su morfología y a su ciclo de vida también se evidencia en su distribución geográfica (Fig. 4). Puede ser transmitido por más de 100 especies de insectos triatomíneos (Hemíptera, Reduviidae y Triatominae) e infectar a más de 70 géneros de mamíferos, que incluye a los humanos (ciclo doméstico) y a una gran variedad de marsupiales, armadillos, primates y roedores (ciclo selvático) (Zingales, 2018). Las DTUs prevalentes en humanos se distribuyen diferencialmente al analizar la región comprendida entre Estados Unidos y Argentina. Las cepas pertenecientes al TcI, son las más predominantes, prevalecen en pacientes de América del Norte (México y Estados Unidos), países de América Central y norte de Sudamérica (Colombia y

Venezuela). En otros países de Sudamérica se observa una mayor heterogeneidad. En Perú, Bolivia y norte de Chile la mayoría de los pacientes se encuentran infectados con parásitos pertenecientes al DTU TcV, mientras que las DTU TcI y TcII son las frecuentes en el resto de Chile. En el centro y este de Brasil, prevalece TcII, en cambio, en la Amazonia, los casos agudos detectados son causados por cepas pertenecientes al DTU TcI y TcIV. En Argentina predominan las TcV y TcVI mientras que en Paraguay (incluyendo las fronteras con Bolivia, Brasil y Argentina) los pacientes se encuentran infectados con cepas de las DTUs TcII y TcV (Brenière, 2016).

Las distintas cepas de *T. cruzi* también difieren en cuanto a las manifestaciones clínicas halladas en pacientes y a su patogenicidad. Si bien la mayoría de las DTUs (TcI-TcVI) se encuentran asociadas a lesiones cardíacas, solo los TcII, TcV y TcIV están asociadas a lesiones en el tracto digestivo (Prata, 2001). Por lo general, la DTU TcI es considerada menos patogénica y en Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay presenta bajas parasitemias y un gran número de casos asintomáticos en estadios crónicos de la enfermedad de Chagas, comparada con TcII, TcV y TcVI (Jiménez, 2019).

## **1.2 Enfermedad de Chagas**

### **1.2.1 Epidemiología**

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una afección parasitaria descrita por Carlos Chagas en 1909. Es una patología endémica en 21 países de las Américas, se estima que cerca de 100 millones de personas están en riesgo de infectarse, unos 6 millones infectadas, con 30.000 nuevos casos anuales por todas las formas de transmisión, provocando unas 12.000 muertes anuales (OMS, 2021).

Si bien la afección comenzó siendo una enfermedad desatendida de zonas rurales y pobres, en las últimas décadas, con los movimientos poblacionales, pasó a ser un problema en las urbanizaciones ya que la mayoría de las personas infectadas viven en entornos urbanos. A su vez, debido a la migración de las poblaciones humanas, se ha extendido a otros países y continentes no endémicos a través de formas de transmisión no vectoriales. En ausencia de vectores naturales, la enfermedad puede transmitirse a través

de transfusiones de sangre infectada, transmisión vertical de madre a hijo, trasplante de órganos, y accidentes de laboratorios (Coura & Viñas, 2010). Por último, se ha descrito también la infección por vía oral, a través de la ingestión de alimentos contaminados con triatomíneos o sus heces conteniendo tripomastigotes y a través del consumo de animales de caza infectados (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012).

## **1.2.2 Patogénesis y manifestaciones clínicas**

La enfermedad de Chagas presenta dos fases: una aguda y una crónica. De no ser tratada, la afección perdura de por vida (OMS, 2021).

### **1.2.2.1 Fase aguda**

La fase aguda de la enfermedad de Chagas se caracteriza por la presencia de parásitos en la sangre de los pacientes, lo cual se puede evidenciar al examinar por microscopía directa un frotis de sangre fresca. Frecuentemente, los pacientes cursan la fase aguda sin percibirla, un 95% de los casos son asintomáticos (Teixeira, 2006). En los casos sintomáticos, pueden manifestar: fiebre prolongada, malestar, dolores musculares y de articulaciones, agrandamiento de hígado, bazo y ganglios linfáticos, o edema subcutáneo (local o generalizado). Estos síntomas pueden aparecer entre 8 a 10 días después de la invasión de los parásitos, o 20 a 40 días después de la transfusión de sangre infectada con *T. cruzi*. Cuando la infección se da de forma vectorial, en el sitio de la picadura y entrada del parásito, se produce un chagoma en la piel, caracterizado por inflamación y eritema indurado, llamado signo de Romaña cuando el sitio de inoculación es en la zona de los párpados (Rassi Jr, 2012).

La muerte en la fase aguda (ocurre en menos del 5% de los pacientes) es causada por miocarditis o meningoencefalitis, con complicaciones concomitantes como bronconeumonía. Los pacientes suelen entrar en remisión espontáneamente y pasar a la fase crónica tras 3 o 4 meses luego del inicio de la infección (Teixeira, 2006).

### **1.2.2.2 Fase crónica**

En esta fase, la infección es detectable principalmente por métodos serológicos (que demuestran la respuesta inmunológica del hospedador frente al parásito) y también por métodos moleculares. La mayoría de los pacientes continuarán sin patologías

demostradas, es decir, sin manifestaciones clínicas. Sin embargo, un 30% de los pacientes, luego de 10 a 30 años de la infección inicial, desarrollarán manifestaciones clínicas que incluyen formas cardíacas, digestivas o cardiodigestivas (Ministerio de la Nación, 2012). Los casos sintomáticos presentan patologías cardíacas en un 94,5% de los casos, mientras que los restantes (un 4,5%) presentan mega-síndromes, que involucran al esófago (megaesófago) y al colon (megacolon) (Teixeira, 2006).

### 1.2.2.3 Miocarditis chagásica

La miocarditis chagásica es la manifestación clínica más frecuente y grave de la fase crónica de la enfermedad de Chagas. La misma conduce a arritmias ventriculares y auriculares, dilatación y falla cardíaca biventricular, aneurismas apicales, tromboembolismos y muerte súbita (Rassi Jr, 2007) (Punukollu, 2007).

Durante la fase aguda, tras la infección inicial de *T. cruzi*, los parásitos se diseminan a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático, y se establecen en distintos tejidos, incluyendo el miocardio y en células ganglionares. En algunos de estos tejidos se encontrarán “nidios de amastigotes” que son agregados intracelulares de formas reproductivas del parásito (Rassi Jr, 2012). El sistema inmunológico genera una reacción inflamatoria local con el fin de controlar la replicación de los parásitos. Sin embargo, las células mononucleares involucradas causan daño tisular local y agrandamiento de los cardiomiocitos, desarrollando una miocardiopatía característica de la fase aguda, la cual, por lo general, suele desaparecer sin dejar rastros (Gazzinelli, 2004).

No obstante, las lesiones cardíacas pueden manifestarse luego de décadas tras la primoinfección y sus consecuencias suelen ser más severas para la salud del hospedador. Este fenómeno podría deberse a la eliminación ineficiente del microorganismo por el sistema inmune, permitiendo que una pequeña población parasitaria persista generando un estímulo antigénico continuo y una reacción inflamatoria crónica. Otra hipótesis, plantea que el daño tisular puede ser causado por una respuesta autorreactiva desencadenada por mimetismo molecular entre el parásito y las proteínas del hospedador, aunque ambas hipótesis, no resultan excluyentes (Kierszenbaum, 2007) (De Bona, 2018).

### 1.2.3 Respuesta inmunológica frente a *Trypanosoma cruzi*

El sistema inmunológico de mamíferos está compuesto por dos componentes: la inmunidad innata (SII) y la adaptativa (SIA). La inmunidad innata es la primera línea de defensa del hospedador frente a patógenos y es mediada por fagocitos, incluyendo macrófagos y células dendríticas (CDs), si bien se lo considera inespecífico, es capaz de reconocer lo propio de lo ajeno. La inmunidad adaptativa se caracteriza por su especificidad y está involucrada en la eliminación de patógenos en la última etapa de la infección y en la generación de memoria inmunológica. La inmunidad protectora contra *T. cruzi* implica el desarrollo tanto de mecanismos de la inmunidad innata como de la adaptativa (Fig. 5).

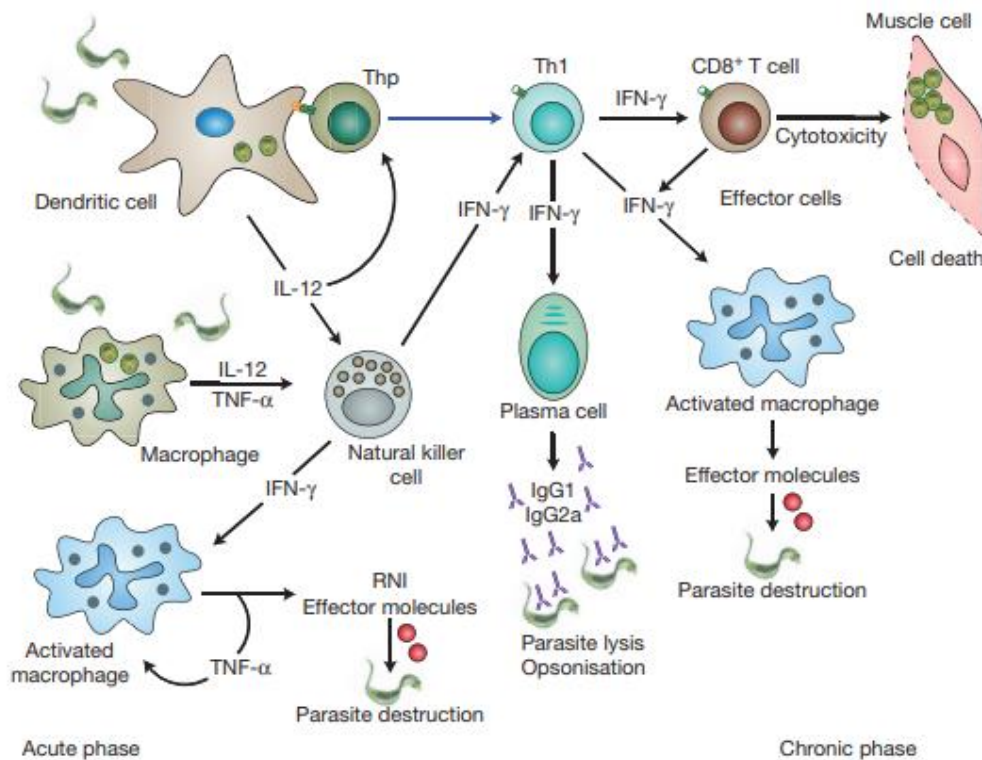


Figura 5. Respuesta inmunológica innata y adaptativa frente a *T. cruzi*. Adaptado de (Junqueira, 2010).

#### 1.2.3.1 Respuesta innata

Las estrategias que emplea *T. cruzi* para garantizar su supervivencia en el hospedador durante un largo plazo incluyen la evasión del fagolisosoma, la expresión de factores de virulencia, la inmunomodulación directa y el establecimiento de sitios de latencia. Los tripomastigotes son capaces de invadir células nucleadas a través de diferentes

mecanismos dependiendo de si la célula diana es fagocítica o no. Los macrófagos son los componentes efectores más importantes del SII en la lucha contra *T. cruzi*, sin embargo, durante infección también pueden ser explotadas por el parásito como su nicho principal, evitando así la inmunidad mediada por células (Morrot, 2016).

El SII reconoce a los microorganismos a través de un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés) codificados por la línea germinal. Los PRRs reconocen ciertos componentes microbianos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés), los cuales son esenciales para la supervivencia del microorganismo. Los distintos PRRs, al reconocer PAMPs específicos, desencadenan diferentes patrones de expresión que activan vías específicas de señalización que generarán distintas respuestas contra el patógeno. Una familia de PRRs bien estudiada es la de los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) los cuales pueden ser hallados tanto en la membrana plasmática como en formas intracelulares. Los TLRs reconocen una gran variedad de estructuras microbianas como LPS de bacterias Gram negativas, ADN viral o componentes de paredes celulares fúngicas. Al activarse, desencadenan la producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias que conducen al reclutamiento de fagocitos al foco de infección que, además de controlar la infección en el sitio, determinarán la respuesta adaptativa adecuada (Akira, 2006). Los receptores TLR-2, TLR-4 Y TLR-9 censan componentes celulares de parásitos protozoarios. La ausencia de TLR-4 y TLR-9 (estudiado mediante ratones deficientes en estos receptores), genera una susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*, lo cual se evidencia con parasitemias elevadas y una mortalidad temprana. A su vez, la producción de IL-12 e INF- $\gamma$  también se ve afectada durante la infección (Bafica, 2006) (Oliveira, 2004).

Las células expuestas a *T. cruzi* producirán IL-12 que promoverá la síntesis de IFN- $\gamma$  por las células “natural killer” (NK). El IFN- $\gamma$  tiene un papel central en el estímulo de los mecanismos efectores como la síntesis de intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI, por sus siglas en inglés) que incluyen al óxido nítrico (NO), el cual tiene un papel esencial en el control de la replicación de los parásitos durante la fase aguda de la infección. A su vez, una segunda señal de inducción para la producción de NO en macrófagos, será la síntesis de TNF- $\alpha$ . La producción inicial de estas citoquinas proinflamatorias originará la

diferenciación de células T helper en un perfil Th1, para la respuesta adaptativa subsiguiente (Gazzinelli, 2004).

A su vez, durante la respuesta innata se pueden producir citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$ , las cuales prevendrían el desarrollo de una respuesta inmune patológica asociada a células T CD4+ y una sobreproducción de IL-12, fundamental para el restablecimiento de la homeostasis (Hunter, 1997) (Silva, 1991).

### 1.2.3.2 Respuesta Adaptativa

Tras el contacto con el parásito, las células dendríticas maduran convirtiéndose en células presentadoras de antígeno (APCs), las mismas migrarán desde el sitio de infección hacia los órganos linfoides secundarios, en donde presentarán a las células T CD4+ antígenos provenientes del patógeno. A su vez, las CD4 activadas expresan moléculas coestimuladoras, IL-12 e IFN- $\gamma$ , esenciales para la activación de las células T y contribuirán, junto a las células NK, en la diferenciación de células T CD4+ vírgenes en células con perfil Th1 o células con perfil Th2. Las células Th2 producirán IL-4 y IL-13, las mismas están involucradas en la respuesta frente a helmintos. En cambio, las células Th1 producen IFN- $\gamma$  e IL-2, las cuales son capaces de inhibir la replicación de patógenos intracelulares como *T. cruzi* (Hoft, 2000).

Una respuesta de las células Th1 no sesgada es crucial para la supervivencia del hospedador ya que dirigirá y potenciará una serie de mecanismos efectores, incluyendo la inducción de la respuesta de anticuerpos adecuada y la activación de células fagocíticas para la eliminación de los parásitos, las que luego colaborarán con otras células T como las CD8+. Las células T CD8+ pueden detectar y destruir a las células infectadas con *T. cruzi*. Se ha demostrado que la ausencia de cualquiera de estos tres mecanismos efectores: anticuerpos, células T CD4+ o CD8+, generará una infección aguda severa y letal. Los linfocitos T CD8+ controlan la infección a través de las vías líticas: FasL/Fas y la secreción de perforinas/granzimas. A su vez, las células T CD8+ producen IFN- $\gamma$ , contribuyendo con la eliminación del parásito, al activar a los macrófagos. El papel de los linfocitos T CD8+ es crucial en el control de la infección de *T. cruzi*. La ausencia de células T CD8+ en ratones genera una enfermedad crónica más severa o una muerte temprana. Mientras que una disminución en la producción de IFN- $\gamma$  por las células T CD8+ está

asociada a un incremento en la severidad de la enfermedad de Chagas en humanos (Martin & Tarleton, 2004).

Como se mencionó, las células T CD4+ también adoptarán en simultáneo, un perfil Th2. Las células Th2 producen tanto citoquinas que estimulan la generación de anticuerpos como antiinflamatorias, tales como: IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (Annunziato & Romagnani, 2009). La sobreproducción de citoquinas Th2 está asociada a una mayor susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*. Las interleuquinas IL-10 e IL-4, en cambio, tendrían un papel fundamental en la regulación de la producción las citoquinas inflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , las cuales inducirían el daño tisular (Savino, 2007) (Abrahamsohn, 2000).

Las células B desencadenarán una vigorosa respuesta ante la infección de *T. cruzi*. La importancia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el control de la infección fue demostrado en modelos de infección murinos. Ratonos mutantes incapaces de producir anticuerpos, a pesar de sobrevivir un tiempo más prolongado que aquellos animales deficientes en células T, no son capaces de controlar el crecimiento parasitario y sucumben ante la infección durante la fase aguda. Pese a esto, los anticuerpos no eliminan efectivamente al parásito, otorgando al microorganismo, la oportunidad de persistir en el hospedador (Kumar & Tarleton, 1998). Muchos de estos anticuerpos, son considerados anticuerpos "líticos" ya que median la lisis celular por la vía del sistema complemento (Krautz, 2000).

#### **1.2.4 Diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad se basa en pruebas parasitológicas, inmunológicas, y moleculares, cuyo uso y utilidad dependerá de la fase en la que se encuentre la enfermedad. Se promueve realizar el diagnóstico a toda persona que haya vivido en una zona donde se encuentre el vector o que su madre o abuela hayan vivido en zona con vinchucas o tenga Chagas. Durante la fase aguda, es posible detectar la presencia de parásitos en sangre por métodos parasitológicos directos como examen de sangre al fresco, extendido coloreado y gota gruesa, o por métodos de concentración de sangre en los que se utiliza un mayor volumen de sangre para aumentar la probabilidad de detectar al parásito como en la técnica de Strout, micrométodo de capilares o con microtubo.

Estos métodos, presentan la ventaja de poder ser realizados en laboratorios de baja complejidad (Ministerio de la Nación, 2012).

Para el diagnóstico de la enfermedad en la fase crónica, donde la parasitemia es muy baja o indetectable, se emplean los métodos inmunológicos que consisten principalmente en la detección de anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi* (Inmunoglobulinas G (IgG)). Las técnicas más utilizadas son: el Ensayo inmunoenzimático (ELISA), la Hemaglutinación indirecta (HAI) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Sin embargo, estas técnicas pueden ser poco específicas, ya que pueden generar reacciones cruzadas con otros parásitos, principalmente con los pertenecientes a la familia Trypanosomatidae. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud recomienda aplicar al menos dos técnicas con la finalidad de tener un alto grado de confiabilidad sugiriéndose una tercera prueba en caso de discrepancia entre ellas (OPS, 2021).

Se ha propuesto la detección por métodos moleculares, a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual presenta una elevada sensibilidad y especificidad, al amplificar fragmentos de ADN del parásito. La PCR es de gran utilidad para el diagnóstico en fase aguda como en fase crónica debido a sus características. Sin embargo, esta técnica también presenta ciertas limitaciones como la baja sensibilidad en la fase crónica debido a la escasez de parásitos circulantes (confinados a tejidos), el método de extracción de ADN y el volumen de sangre que se emplea para la extracción de ADN. A su vez, el costo y la necesidad de equipos e infraestructura especializada también resultan desventajas en su implementación (si bien esta situación se ha revertido recientemente por la necesidad de implementar laboratorios de diagnóstico molecular durante la pandemia de Covid-19). Por estas razones, a fin de realizar un diagnóstico certero es recomendable aplicar el uso de una combinación de técnicas parasitológicas, serológicas y moleculares de acuerdo a la fase de la enfermedad que se sospecha y las características del paciente (Ferrer, 2015).

### **1.2.5 Tratamiento**

En la actualidad, no se encuentran disponibles vacunas para la enfermedad de Chagas. Los tratamientos terapéuticos son limitados, incluyen a las drogas nitroheterocíclicas: benznidazol y nifurtimox, ambas de administración oral. Ambos medicamentos resultan

efectivos para curar la afección (negativización de la parasitemia y de la serología) o reducir significativamente la carga de parásitos en 60% a 85% de los casos en fase aguda. Su administración en pacientes en fase crónica, también han resultado ser, en menor medida, efectivas en la curación de la enfermedad, demostrada por la seroconversión negativa, siendo más alta la tasa de curación en niños y adolescentes que en adultos. Adicionalmente, el tratamiento tripanocida en estadios crónicos podrían demorar el desarrollo de las afecciones viscerales y reducir, en personas menores de 50 años con lesiones cardíacas, la progresión a estados clínicos más severos. Las manifestaciones cardíacas, digestivas y neurológicas suelen requerir de tratamientos específicos (Ministerio de la Nación, 2012).

Si bien estos medicamentos son indicados para evitar o frenar la progresión de la enfermedad, presentan ciertas desventajas considerables como ser su toxicidad, los costos, la distribución limitada en zonas rurales y la aparición periódica de resistencia (Altamura, 2020). Las reacciones adversas debidas a la medicación, aparecen en un 40% de los pacientes tratados y la frecuencia e intensidad suele ser mayor con el aumento de la edad. El benznidazol y el nifurtimox no deben administrarse a las embarazadas ni a las personas con insuficiencia renal o hepática. El nifurtimox también está contraindicado en personas con antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos (Ministerio de la Nación, 2012) (OMS, 2021).

### **1.3 Proteínas High Mobility Group**

Las proteínas High Mobility Group (HMG) son factores arquitectónicos nucleares que están implicados en el remodelado la cromática en los distintos eventos nucleares. Son las proteínas no-histonas más abundantes de la cromatina. Las proteínas HMG se clasifican en tres familias HMGA, HMGB Y HMGN. Todas las HMGs son proteínas pequeñas de menos de 30 kDa y sufren extensas modificaciones postraduccionales. Los miembros de cada familia poseen estructuras divergentes, pero funciones generales similares: se unen a la cromatina de forma dinámica y reversible, dentro de los nucleosomas (en el caso de las HMGN), a complejos multiproteicos de factores

transcripcionales y cofactores (HMGA) o a ambos, nucleosomas y factores transcripcionales (HMGB) (Bianchi & Agresti, 2005). Las familias se han nombrado en referencia a sus dominios de unión a ADN:

- Las proteínas HMGA contienen un "AT-hook", segmentos de nueve aminoácidos desestructurados que se unen a tramos de ADN ricos en AT del surco menor.
- Las proteínas HMGB contienen "HMG boxes", dominios de 80 aminoácidos que se unen al surco menor del ADN con baja especificidad de secuencia.
- Las proteínas HMGN se unen dentro de los nucleosomas, entre la hélice de ADN y el octámero de histonas.

### 1.3.1 Proteínas High Mobility Group B (HMGB)

Las proteínas HMGB de mamíferos se caracterizan por contener dos dominios HMG box en tándem seguidos de dominio con carga negativa denominado "cola ácida C-terminal". La proteína HMGB1 de mamíferos tiene una señal de localización nuclear (NLS) bipartita que dirige la proteína al núcleo. La mayoría de las proteínas HMGB contienen uno o dos dominios HMG box, sin embargo, algunas pueden contener hasta 6. Las HMGBs que se encuentran relacionadas a la cromatina, también llamadas proteínas HMGB "canónicas", representan un pequeño y específico subconjunto que contiene invariablemente dos dominios HMG box en tándem, los mismos se unen al ADN con una muy limitada especificidad de secuencia (Sessa & Bianchi, 2007).

Todas las proteínas HMGB son proteínas nucleares que, por su capacidad de alterar la estructura de la cromatina, están involucrados en procesos fundamentales para la célula como el control transcripcional, replicación, reparación del ADN y recombinación homóloga. Más allá de sus funciones nucleares, la proteína HMGB1 de mamíferos (mHMGB1) puede ser secretada al medio extracelular bajo condiciones de estrés celular (Bianchi & Agresti, 2005) (Štros, 2010).

El sistema inmunológico innato además de discriminar entre lo propio y lo extraño, es capaz de reconocer a moléculas endógenas asociadas a células o matriz extracelular producida como consecuencia de daño tisular. Estos mediadores derivados del

hospedador son conocidos como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por sus siglas en inglés). Los DAMPs son, por lo general, proteínas endógenas nucleares y citosólicas que, en condiciones normales, cumplen roles intracelulares. Ante condiciones de estrés celular, causado por daño o injuria tisular, estas moléculas promueven una respuesta del sistema inmune innato y adaptativo, y abandonan su rol intracelular (Matzinger, 1994). La proteína mHMGB1 ha sido identificada como un miembro de la familia de moléculas DAMPs, será “visible” ante injurias celulares, si la muerte celular fue programada no será perceptible para el sistema inmune (Scaffidi, 2002). Al liberarse al medio extracelular, mediará procesos inflamatorios, migración celular, proliferación y diferenciación (Klune, 2008).

Las modificaciones postraduccionales como la acetilación, metilación y fosforilación, gobernarían la localización de mHMGB1. Tras la activación, se encontró que los monocitos y macrófagos hiperacetilan su mHMGB1 en la región NLS promoviendo su relocalización al citosol (Lu, 2014). A su vez, en monocitos, la relocalización citoplasmática de mHMGB1 puede ser regulada por la fosforilación de la región NLS, mecanismo que dependería de la actividad de la proteína quinasa C (Oh, 2009). Por otro lado, en neutrófilos, la translocación citosólica de mHMGB1 está asociada a la metilación de la Lys42, que provocaría una disminución en su afinidad por el ADN, permitiendo la translocación (Ito, 2007).

La proteína mHMGB1 es capaz de unirse a múltiples receptores. Hasta el momento, se han identificado más de 15 receptores de mHMGB1 diferentes, a algunos se podrá unir directamente como los receptores RAGE, TLR4/MD, TIM3, entre otros. Mientras que otros requerirán de la formación de complejos con otros ligandos (Pasheva & Ugrinova, 2016). Los TLRs son capaces de reconocer DAMPs y activar una respuesta inmunológica innata para la defensa contra infecciones e injurias (Akira & Takeda, 2004). Se ha demostrado que la proteína mHMGB1 al interactuar con TLR2, TLR4, y TLR9 induce la secreción de citoquinas proinflamatorias (Yang & Tracey, 2012).

El estado redox de mHMGB1 también tiene un papel esencial en la regulación de su función extracelular (Tang, 2011). La proteína mHMGB1 posee tres cisteínas en las posiciones 23, 45 y 106. Esto permite tres estados de oxidación diferentes que otorga tres funciones mutuamente exclusivas: alarma, quimioatracción y tolerancia

inmunológica (Yang, 2012) (Kazama, 2008). En consecuencia, las modificaciones postraduccionales orquestarían la actividad de mHMGB1 desde la localización celular hasta la función extracelular y así, actuar como un interruptor funcional crucial (Bertheloot & Latz, 2017).

### 1.3.2 Proteína HMGB de *Trypanosoma cruzi* (TcHMGB)

La proteína TcHMGB, una proteína de *T. cruzi* perteneciente a la familia HMGB, fue caracterizada por primera vez en nuestro grupo de laboratorio. A partir de ensayos *in vitro*, observamos que TcHMGB puede unirse a estructuras del ADN distorsionadas y es capaz de doblar ADN lineal como otros miembros de la familia HMGB (Cribb, 2011). En estudios *in vivo*, TcHMGB también mostró ser capaz de actuar como factor arquitectónico, ya que la sobreexpresión de la proteína indujo cambios en la estructura nuclear y una disminución en la relación heterocromatina:euromatina. Además, su sobreexpresión afectó ciertas funciones relacionadas con la patogenicidad del parásito como la pérdida de eficiencia de infección *in vitro* por parte de los tripomastigotes de *T. cruzi*. En conjunto, los resultados sugieren que la proteína tendría un papel fundamental en la biología del parásito (Tavernelli, 2019).

La estructura de TcHMGB incluye dos dominios HMG box similares a los hallados en proteínas ortólogas de eucariotas pluricelulares, y una región N-terminal única de tripanosomátidos (Fig. 6) (Cribb, 2011). Se diferencia de las HMGB de metazoarios por no contener la cola ácida en la región C-terminal, la cual modularía las funciones biológicas de la mHMGB1 al interactuar con los dominios HMG box y la cromatina (Kawase, 2008). La otra diferencia sustancial respecto a otras HMGBs es la presencia de una región N-terminal de 110 aminoácidos, altamente conservada entre tripanosomátidos (similitud del 70-80%) y que contiene una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio de unión al ADN llamado dominio "DEK-C terminal" (Cribb, 2011).



Figura 6. Modelo tridimensional de la proteína TcHMGB predicho por el algoritmo Tasser (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>). Se muestra las distintas regiones y puede apreciarse el plegamiento típico de los dominios HMG-box con 3 a-hélices formando una “L” o “V”, por donde interacciona con el ADN. Adaptado de: (Cribb, 2011).

En base a lo observado en mHMGB1 y su papel como mediador de la respuesta inflamatoria, se estudió si TcHMGB era capaz también de estimular la respuesta inmune, lo cual podría influir en la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Se halló que la proteína es traslocada del núcleo al citoplasma y secretada al medio extracelular. Los sitios de localización nuclear (NLS) de mamífero no se encuentran conservados en kinetoplastidos. Sin embargo, se ha predicho que la proteína TcHMGB presenta un NLS putativo hacia el final de la región N-terminal. Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que esta región es funcional y necesaria para su localización en el núcleo, ya que la versión trunca de la proteína TcHMGB, que carece de la región N-terminal, se distribuye en todo el citoplasma de epimastigotes. Ensayos preliminares sugieren que la acetilación podría estar involucrada en la translocación de la proteína. Tratamientos con inhibidores de desacetilasas (DACis, por sus siglas en inglés), que inducen la hiperacetilación de las proteínas, causaron la relocalización de TcHMGB al citoplasma y un aumento en la secreción al espacio extracelular (Cribb, 2017).

Por otro lado, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, se observó que TcHMGB es capaz de inducir la expresión de citoquinas tanto proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) como antiinflamatorias (IL-10 y TGF- $\beta$ ), tal como su ortóloga de mamíferos mHMGB1. Ensayos inmunohistoquímicos en tejidos de un modelo de Chagas murino, mostraron una fuerte señal de TcHMGB en los tejidos marcados, no solo en el interior de las células infectadas

sino también en el medio extracelular en un patrón similar a las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1b e IFN- $\gamma$ . Esto sugiere que TcHMGB podría ser secretada por amastigotes. En el modelo experimental ensayado, la TcHMGB se detectó principalmente en cortes de tejido de estadios agudos de la enfermedad, y no así en los correspondientes a etapas crónicas, lo que sugiere que TcHMGB sería secretada en estadios tempranos de la infección de *T. cruzi* contribuyendo a la inducción de la respuesta inflamatoria (Cribb, 2017).

**Hipótesis de trabajo:** Basándonos en nuestros resultados y en evidencias recogidas de la bibliografía sobre proteínas relacionadas, proponemos que la proteína HMGB de *T. cruzi*, podría tener un rol importante en la infección por *T. cruzi* y en la respuesta inmune del hospedador, ya sea como antígeno circulante o bien estimulando la expresión de citoquinas capaces de regular la respuesta. La presencia de TcHMGB y anticuerpos específicos en sueros y tejidos de personas y animales infectados con *T. cruzi*, sugieren además que TcHMGB podría ser un buen marcador de infección, y por lo tanto ser considerado para el diseño de un método de diagnóstico rápido aplicable a campo, que luego deberá ser corroborado por métodos convencionales.

## 2 Objetivos

**Objetivo general:** Continuar con la caracterización de TcHMGB y evaluar su potencialidad como marcador de la infección y su posible aplicación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando un modelo experimental de Chagas murino.

**Objetivos específicos:**

1. Realizar un análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la proteína TcHMGB en la base de datos TriTrypDB.
2. Caracterizar un modelo de Chagas murino experimental infectando ratones BALB/c con la cepa Dm28c de *T. cruzi*
3. Confirmar la especificidad de los anticuerpos anti-TcHMGB y anti-HMGB1 (de mamífero) frente a las proteínas del parásito y del hospedador respectivamente.

## 3 Materiales y Métodos

### 3.1 Herramientas Bioinformáticas

Para el análisis de la secuencia de TcHMGB se utilizó la base de datos TriTrypDB (<https://tritrypdb.org>), una base de datos integrada que proporciona acceso a conjuntos de datos a escala genómica para parásitos de clase Kinetoplastea (Aslett, 2010).

Para la predicción ortológica se utilizó OrthoMCL (<https://orthomcl.org/orthomcl/>), un algoritmo para agrupar proteínas en grupos de ortólogos en función de su similitud de secuencia.

Los alineamientos múltiples fueron llevados a cabo en Jalview 2.22.1.0: es un programa gratuito para la edición, visualización y análisis de alineación de múltiples secuencias (Waterhouse, 2009), fueron realizados a partir de los algoritmos: Clustal OWS (Sievers, 2011) y MAFFT (Katoh, 2002).

Las bases de datos, Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y SUPERFAMILY (<http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/>) fueron utilizadas para analizar los dominios y sitios funcionales estudiados.

Figuras decoradas fueron generadas con la herramienta ESPript.cgi 4.0.10 (Robert & Gouet, 2014).

Para predicciones de la localización celular de la proteína se utilizó MITOPROT (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>), y WoLF PSORT (<http://wolfpsort.org/>). Para predicción de anclaje de GPI: Big-Pi predictor (Eisenhaber, 1999).

Para la predicción de la señal de localización nuclear (NLS) se utilizó el algoritmo ProteinPredict (<https://predictprotein.org/>) (Bernhofer, 2021). Las potenciales modificaciones postraduccionales fueron predichas por los algoritmos: PAIL (<http://bdmpail.biocuckoo.org/>; (Li, 2006)), NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>, (Blom, 1999) ) Methyl-Pse AAC (<http://www.jci-bioinfo.cn/iMethyl-PseAAC>; (Qiu, 2014)), MusiteDeep

(<https://www.musite.net/>; (Wang, 2020)) y GPS-SUMO (<http://sumosp.biocuckoo.org/online.php>; (Zhao, 2014)).

## **3.2 Manipulación de animales y muestras histopatológicas**

### **3.2.1 Animales**

Se utilizaron ratones BALB/c machos de 6-8 semanas de edad, criados y mantenidos en el Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos (CYPREB). Los animales fueron alojados en racks ventilados con filtros HEPA, con control de humedad (40-70%) y temperatura (21-23 °C), en cajas plásticas (aprox. 25 x 35 cm) con tapa de rejilla y camas de viruta de madera estéril. Los animales fueron expuestos a un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Se les suministró comida y bebida estéril ad libitum. La manipulación de los animales (cambios de caja y tratamientos), se realizó en estaciones de cambio bajo flujo laminar. La obtención de las distintas muestras se llevó a cabo bajo anestesia, utilizando ketamina-xilacina a una dosis de 100 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente seguido de eutanasia por inhalación de CO<sub>2</sub>. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos recomendados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de FCM-UNR, los que fueron aprobados mediante Resolución CD n° 2477/2016.

### **3.2.2 Esquema de infección**

Se realizaron dos experimentos de infección. Para la primoinfección se utilizaron tripomastigotes de *T. cruzi* provenientes de un modelo de infección *in vitro* de células Vero. En el primer experimento, 8 ratones divididos en dos grupos (n=4/grupo) fueron infectados con dos dosis de inoculación: 1000 parásitos/ratón y 5000 parásitos/ratón (Fig. 7). En el segundo experimento, 24 animales fueron infectados con la dosis optimizada que surgió del primer experimento y otros 6 animales fueron apartados como control no infectado (CNI) (Fig. 8). Dentro del grupo de animales infectados, 6 fueron asignados para evaluar sobrevida. Los animales fueron inoculados por vía intradérmica con las dosis mencionadas.

En el primer experimento, todos los animales fueron sacrificados al día 42 postinfección (pi) mientras que en el segundo experimento se sacrificaron en los días 5, 7, 10, 14 y 21 pi (n=3-4), los animales destinados a evaluar sobrevida se mantuvieron hasta el día 56 pi. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardiaca con anticoagulante EDTA, luego fueron centrifugadas durante 10 minutos a 5000 rpm para extraer el plasma y guardadas a -70°C hasta su utilización. Los órganos corazones, hígados, ganglios linfáticos y bazos fueron extraídos y cortados transversalmente en tres secciones. En este trabajo, solo fueron utilizados los tejidos cardíacos y esplénicos, los demás órganos fueron almacenados a -70°C para ensayos futuros. Los tejidos fueron colocados en Tissue-Tek (Miles Inc., Elk hart, USA) y RNAlater (Invitrogen™, EE.UU).

### Experimento 1

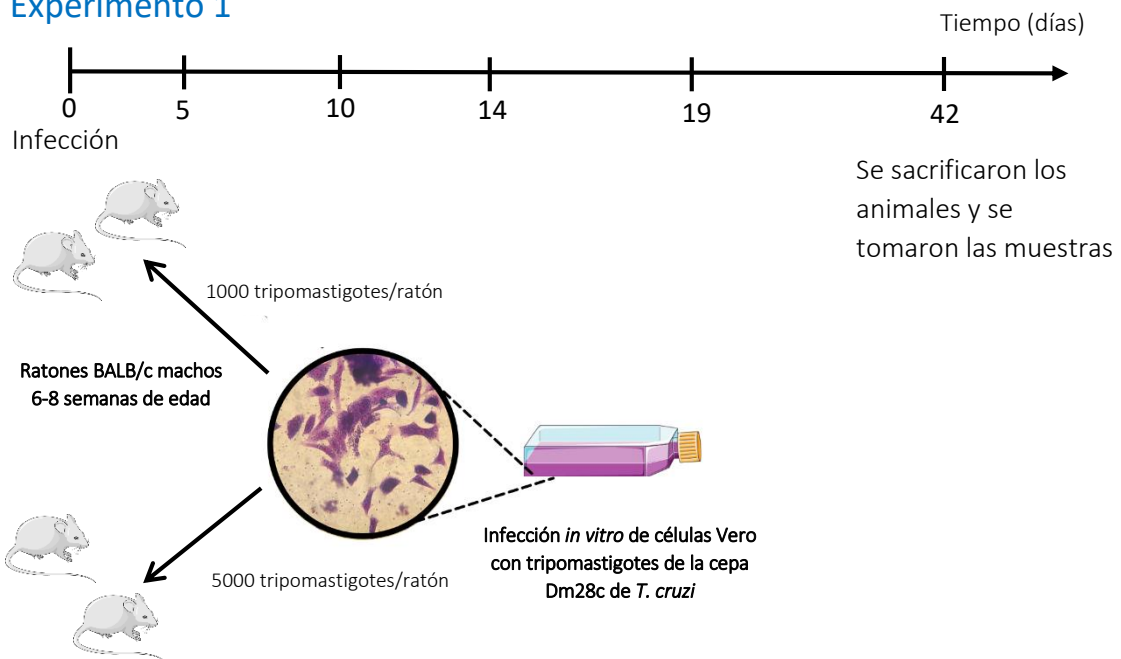
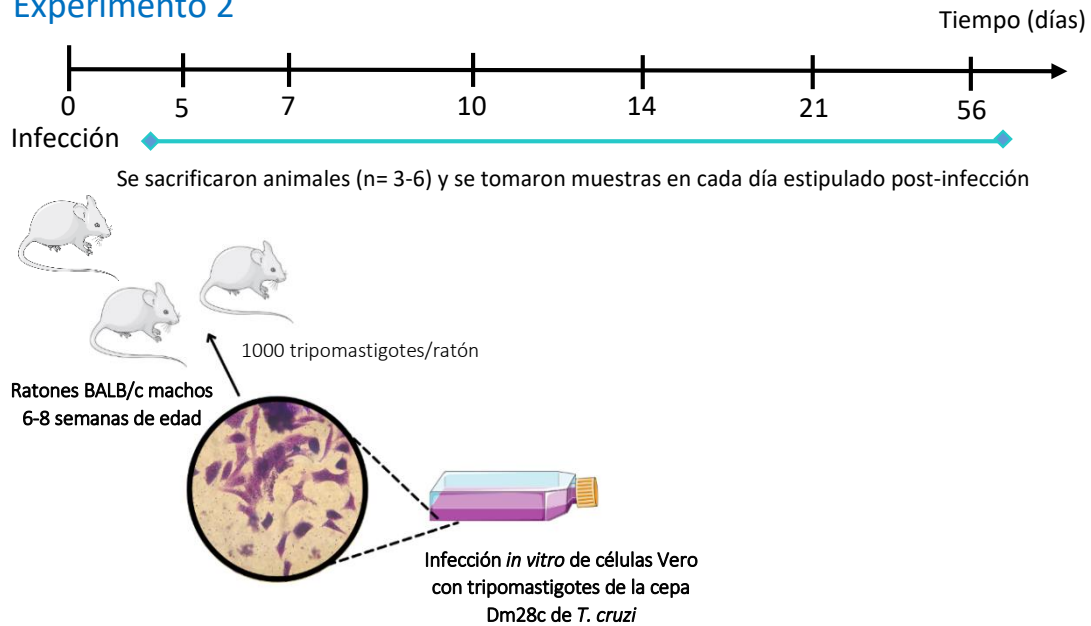


Figura 7. Esquema de infección para determinar la dosis adecuada a inocular. Ratones BALB/c fueron infectados con *T. cruzi* o inocularon con solución salina (CNI) y se evaluó la dosis óptima a infectar sacrificando los animales al día 42 pi. En los tiempos 5,10, 14, 19 y 42 se evaluó parasitemia y estado general de los animales.

## Experimento 2



Figuro 8. Esquema de infección del segundo experimento. Ratones BALB/c fueron infectados con *T. cruzi* o inocularon con solución salina (CNI). En los días 5, 7, 10, 14, 21 y 56 se sacrificando los animales, obteniéndose plasma donde se evaluó parasitemia y extrayendo los tejidos cardíacos, ganglio, bazo e hígado, los mismos fueron guardados según se detalla en el texto para su posterior procesamiento y evaluación.

Los tiempos escogidos para estos experimentos se eligieron en base a lo observado la bibliografía y datos previos en nuestro laboratorio, ya que se considera que, tras 50 días de la primoinfección, la infección crónica. También buscamos mantener a los animales el mayor tiempo posible para evaluar la sobrevida.

### 3.2.3 Parasitemia, sobrevida y peso del bazo

Las parasitemias se estudiaron por microscopía directa según el método de Brener (5  $\mu$ L de sangre heparinizada analizada entre portaobjeto y cubreobjeto de 22 mm x 22 mm) (Brener, 1962) a distintos días pi. Los datos obtenidos se expresaron en número de parásitos cada 50 campos microscópicos (Magnificación 40X). La sobrevida se monitoreo de forma diaria y el peso de los bazos se obtuvo cuando se sacrificaron a los animales en los distintos días pi descriptos.

### 3.2.4 Histopatología

Los tejidos cardíacos obtenidos al sacrificar a los animales en los días 5, 7, 10, 14, 21 y 56 fueron procesados mediante técnicas histológicas de rutina (fijación en formol al 4% y posterior inclusión en parafina). A continuación, se realizaron cortes histológicos seriados de 5  $\mu$ m, los cuales fueron coloreados con hematoxilina-eosina (éstos procedimientos se realizaron en el Servicio de Morfología de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR). En los cortes de tejido cardíaco (3 o 4 cortes por animal) se evaluó el infiltrado inflamatorio teniendo en cuenta el tamaño y tipo de foco, en base a lo cual se confeccionó un score a fin de estimar la gravedad de la miocarditis. También se evaluó la presencia de nidos de amastigotes. El score se calculó en base a los siguientes hallazgos: ausencia de focos (Ausencia); focos leves: Infiltración leve con daño de una o dos fibras miocárdicas (Leve), focos moderados: infiltrados que comprometen 3-5 fibras musculares (Moderado); focos intensos: infiltrado abundante con destrucción de más de 5 fibras musculares (Intenso). (6 campos por corte/animal, Magnificación 10X).

### 3.2.5 Análisis estadístico

Los gráficos y análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prima 9.0.2. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM (n=3-5/día/grupo), utilizando el test One-way ANOVA y el test de múltiples comparaciones de Tuckey. Se consideró diferencia significativa  $p < 0,05$ . Los parámetros analizados fueron el peso del bazo y los parásitos encontrados en sangre en los distintos días pi.

## 3.3 Manipulación de cepas bacterianas

### 3.3.1 Cepas bacterianas de *E. coli*

Cepa	Genotipo y propiedades relevantes
BL21 (DE3) /pDEST 17 (Glu)- TcHMGB.	(F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal [lon] (DE3 immP21 int- lac+ lacUV5::lacZ::T7

	RNApolimerasa) (Studier, 1990). Contiene un plasmido PDEST17 (Glu)- TcHMGB, que posee incluido el marco abierto de lectura de TcHMGB.
--	---

### 3.3.2 Medio de cultivo para cultivos bacterianos

Se utilizó el medio Luria Bertani (LB) para crecimiento y mantenimiento de las cepas bacterianas (Sambrook & Maniatis, 1989). Su composición es:

Peptona 10 g/l

NaCl 5 g/l

Extracto de levadura 5 g

H<sub>2</sub>O c.s.p.

Para la selección de bacterias transformantes, se adicionó el antibiótico cuya resistencia otorgaba el plásmido en estudio. La concentración final de trabajo fue:

Ampicilina (Amp) 0,1 mg/ml

### 3.3.3 Crecimiento bacteriano

Las cepas fueron cultivadas con agitación (250 rpm) en medio de cultivo líquido en baños termostatzados, o en medio sólido en estufas a 37 °C. Para realizar medidas de crecimiento de cultivos bacterianos se midió la DO<sub>600nm</sub> en espectrofotómetro Ultrospect 2000 UV/vis (Pharmacia, Biotech).

## 3.4 Plásmidos

Vector	Descripción
pDEST 17 (Glu)- TcHMGB	Vector de destino del Sistema Gateway® que permite la expresión del fragmento de interés fusionado a una cola de seis histidinas en su extremo amino-terminal.

	La expresión del gen de interés está bajo el control del promotor lac. Contiene el marco abierto de lectura de TcHMGB.
--	--

### **3.5 Manipulación de cultivos de células Raw**

#### **3.5.1 Cultivos celulares de células Raw 264.7.**

La línea celular murina de macrófagos Raw 264.7 fue cultivada en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM, Invitrogen, USA) suplementado con suero fetal bovino 10%(v/v) (FCS, Natocor, Argentina) y antibióticos 1% (v/v) (penicilina 10000 unidades/ml y estreptomycin 10000 g/ml, Sigma, Argentina) en una atmosfera humidificada con un contenido de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Las células fueron distribuidas en placas de 24-well con una densidad de 4,5x10<sup>5</sup> células/well y mantenidas por 24 hs en medio DMEM suplementado con una mezcla antibióticos 1% (v/v). Pasadas las 24 hs de adhesión de las células, al medio se le adicionó LPS (100 ng/ml), rTcHMGB (10 µg/ml) y tripomastigotes (14,7x10<sup>4</sup> parásitos/ml) de *T. cruzi Dm28c* en los pocillos correspondientes. Solo se adicionó DMEM suplementado a los controles no estimulados. Tras 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron en frio a -80 °C. La muestra que contenía a los tripomastigotes fue centrifugada durante 10 min a 7000 rpm para eliminarlos y se almacenaron tanto sobrenadante como pellet en las mismas condiciones. Las células adheridas fueron lavadas con tampón fosfato salino 1X (PBS) estéril y luego se recolectaron con una solución de Verseno (Thermo Fisher Scientific, Argentina). Luego, tras centrifugar durante 5 min a 2500 rpm se almacenaron los pellets en frio a -80 °C. De los extractos celulares se purificaron proteínas totales y ARN total utilizando el kit NucleoSpin® RNA/Protein.

## **3.6 Manipulación de proteínas**

### **3.6.1 Ensayos de inducción de la expresión de proteínas recombinantes en cultivos de *E. coli* BL21 (DE3)**

Un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) saturado (ON) crecido a 37 °C con agitación vigorosa (200 rpm) que contenía el plásmido de interés pDEST 17 (Glu)- TcHMGB, se diluyó 1/50 en un volumen final de 250 ml de LB adicionado con el antibiótico que corresponda. Se incubó a 37° C durante 1 a 2 hs hasta alcanzar un crecimiento exponencial (DO 0.6-1). Para la inducción se utilizó una concentración final de IPTG de 0.05 a 1 mM y se incubó a 37 °C durante 4 horas.

Para extraer las proteínas totales de los cultivos, se prosiguió a centrifugar durante 10 min a 6000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de células en 4 ml de una solución tampón de lisis adecuado. Se incubaron las muestras en hielo por 15 minutos para dejar actuar la lisozima, luego se sonicaron en frío con 25 pulsos de 23% de amplitud durante 15 segundos. Se centrifugó a velocidad máxima (15000 rpm) durante 20 min a 4 °C, se separó el sobrenadante del sedimento, y este último se resuspendió en la misma solución tampón de lisis, y se guardaron todas las fracciones a -20 °C para su posterior análisis por SDS-PAGE.

Solución tampón para lisar cultivos BL21 DE3-pDEST17-TcHMGB:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 8, NaCl 300mM, Imidazol 10 mM, lisozima 1 mg/ml, coctel de inhibidores de proteasas 0,5% y de PMSF 1 mM.

### **3.6.2 Purificación en condiciones nativas de TcHMGB como fusión a Histidinas**

Se escogió una cromatografía de afinidad en columna con una resina de níquel-agarosa para purificar la proteína TcHMGB expresada como fusión a una cola de histidinas. Se montó el armado de la columna níquel-agarosa (aproximadamente 0,5 ml de lecho / 200 ml de cultivo), se lavó con varios volúmenes de agua destilada y se equilibró la columna incubándose con la solución de lisis durante una hora en rotor a 4 °C. A partir de aquí se

trabajó en frío a 4 °C para evitar la degradación de proteínas. Se pasó el extracto de proteínas solubles por la columna tres veces o se incubó durante una hora. Luego, se recolectó todo el lisado que eluye por la columna que corresponde a las proteínas que no se pegan a la matriz, denominado “flowthrough”. Se lavó la columna con 100 ml de solución de lisis y se eluyó la proteína de fusión con 5 ml de solución de elución. Los primeros 0,5 ml corresponden al volumen muerto de la columna que se nombró como E<sub>0</sub>. La elución se colectó en porciones de 0,7 a 1 ml. En cada etapa descrita se tomaron alícuotas que fueron analizadas por SDS-PAGE a modo de evaluar y monitorear la purificación.

Solución tampón de lisis: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8, NaCl 300mM, Imidazol10 mM, suplementado con DTT 1 mM y PMSF 1 mM.

Solución tampón de elución: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 8, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, suplementado con DTT, DNAsa e inhibidores de proteasas (en las concentraciones indicadas en la sección 3.6.1)

### **3.6.3 Concentración de proteínas purificadas**

Se tomaron las fracciones de elución con mayor cantidad de la proteína de interés, se introdujeron en filtros para centrifugación Centriprep YM-10 o Amicon® Ultra 4 ml Millipore, con tamaño de poro de 10 KDa, y se centrifugaron durante 2 hs a velocidad baja de 3500 g a 4 °C.

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

Para analizar los extractos de proteínas de cultivos bacterianos se empleó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), que separa y resuelve las proteínas en función de su relación masa/carga. Se arman dos geles de poliacrilamida: un gel de concentración, que permite que las proteínas comiencen a migrar en un mismo punto de partida, y un gel de resolución que realiza la separación propiamente dicha. Los geles de concentración se prepararon con poliacrilamida al 4%, mientras que los geles de resolución se armaron con poliacrilamida al 12%.

A las muestras se les agregó solución de siembra en una relación 4:1 (muestra: solución), se las hirvió 5 minutos, se centrifugó y se sembró el sobrenadante. Los geles fueron montados en un equipo vertical de electroforesis BioRad Mini Protean III, y la corrida se realizó en una solución amortiguadora de Tris-Glicina-SDS durante aproximadamente una hora a 20 mA por gel, fijando voltaje y resistencia. A continuación, se tiñó el gel con azul de Coomassie y se destiñó para ser finalmente escaneado para su digitalización.

Geles de poliacrilamida de concentración: Tris-HCl pH 6,8 167 mM, SDS 0,1%

Geles de poliacrilamida de resolución: Tris-HCl pH 8,8 375 mM, SDS 0,1%

Solución de Siembra 5X: Tris-HCl pH 6,8 100 mM, SDS 2%, DTT 200 mM, glicerol 20% y azul de bromofenol 0,1%

Solución de Corrida 5X: 15,1 g/l Tris base; 72 g/l glicina; 5 g/l SDS.

Solución de tinción: Coomasie Brilliant Blue R250 1% (p/v) en 2-propanol: ácido acético: agua en relación 10:25:65

Solución de destinción: etanol: ácido acético: agua en relación 10:10:80.

### ***3.7 Detección de proteínas utilizando anticuerpos específicos***

#### **3.7.1 Western Blot**

La proteína recombinante TcHMGB se sembró en un SDS-PAGE 12% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Luego, la membrana se bloqueó con PBS-leche 5% y se recortó en tiras. Las distintas tiras se incubaron durante una hora con anticuerpos primarios  $\alpha$ -TcHMGB purificado en conejo ( $\alpha$ -TcHMGB r) utilizando dos diluciones (1/500 y 1/1000),  $\alpha$ -TcHMGB purificado en ratón ( $\alpha$ -TcHMGB m) (dilución 1/1000),  $\alpha$ -HMGB1 comercial (Abcam, Estados Unidos) utilizando tres diluciones (1/100, 1/500 y 1/1000), diluidos en PBS-Tween 20 0,1%. En el control negativo solo se adicionó PBS-Tween 20 0,1%

En otro ensayo, se sembraron los sobrenadantes y extractos celulares de células Raw 264.7 en un SDS PAGE 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Luego, las membranas se bloquearon con PBS-leche 5%. Las membranas se incubaron con el

anticuerpo primario  $\alpha$ -HMGB1 comercial (Abcam, Estados Unidos) diluido en PBS-Tween 20 0,1%.

En ambos casos, una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS-Tween 20 0,1%. las membranas se incubaron durante una hora con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y/o anti-IgG de ratón, según corresponda, conjugados a la enzima peroxidasa de rábano y se realizaron nuevamente tres lavados de 10 min con PBS-Tween 20 0,1%. A continuación, se las incubó durante 5 min en oscuridad con una solución de luminol (Solución A) y una solución de peróxido (Solución B), ambas perteneciente al Kit Amersham™ ECL Select™ (Cytiva, USA) y se reveló por quimioluminiscencia en el visualizador de imágenes Amersham Imager 600 (Cytiva, USA).

## 4 Resultados y Discusión

### 4.1 Análisis Bioinformático

Dadas las circunstancias epidemiológicas vividas durante el año 2020, nos vimos obligados a replantearnos nuestras formas de trabajo para poder avanzar a pesar de las restricciones de presencialidad. Este trabajo de tesina, planteado previo al comienzo de la pandemia, fue reestructurado añadiendo una sección *in silico* del análisis de la proteína estudiada por nuestro grupo de laboratorio.

#### 4.1.1 TriTrypDB

La base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>) es una base de datos integrada que proporciona acceso a un conjunto de datos a escala genómica de organismos pertenecientes a la clase de Kinetoplastidae. TriTrypDB es un proyecto colaborativo que utiliza la infraestructura computacional GUS/WDK desarrollada por el Centro de Recursos Bioinformáticos de Patógenos Eucariotas (EuPathDB.org, por sus siglas en inglés) para integrar la anotación y análisis de genomas de GeneDB y otros sitios con una amplia variedad de conjuntos de datos genómicos funcionales puestos a disposición por miembros de la comunidad de investigación global, a menudo antes de la publicación (Aslett, 2010). La base de datos contiene los genomas de 74 organismos, algunos de vida libre como *Bobo saltans* y otros parásitos como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* o *Crithidia fasciculata*. Las descripciones de los genes incluyen información existente sobre su localización genómica, literatura en la que se encuentra descrito, taxonomía, ortología, sintenia, datos de transcriptómica, análisis de secuencia, análisis de estructura, características proteicas, conocidas y obtenidas a partir de predictores adosados, entre otras.

Se encuentran disponibles los genomas actualizados de 28 cepas de *T. cruzi* pertenecientes a las DTUs TcI, II, III, V, VI y Tcbat (Tabla I). Las diferencias en los tamaños de los genomas alcanzan los 66,32 Mpb, esto se da entre las cepas CL (TcVI) y S44a (TcII) evidenciando la amplia plasticidad genómica que presentan estos organismos.

Cepa de <i>T. cruzi</i>	DTU	Tamaño (Mpb)	Año de lanzamiento del genoma	Tecnología de secuenciación	Cita
CL	TcVI	65	2018	Roche 454 GS FLX+	(Bradwell, y otros, 2018)
Tula cl2	TcVI	83,51	2014	Roche 454 FLX Titanium	(Hamilton, y otros, 2011)
Bug2148	TcV	55,16	2018	PacBio	(Callejas-Hernández, Gironès, & Fresno, Genome Sequence of Trypanosoma cruzi Strain Bug2148, 2018)
231	TcIII	35,36	2018	NGS Illumina HiSeq 2000	(Baptista, y otros, 2018)
Brazil A4	TcI	45,56	2019	PacBio	(Wang, y otros, 2021)
G	TcI	25,17	2018	Roche 454 GS FLX+	(Bradwell, y otros, 2018)
Y	TcII	39,04	2018	Illumina MiSeq	(Callejas-Hernández, Rastrojo, Poveda, Gironès, & Fresno, 2018)
Y C6	TcII	47,22	2019	PacBio	(Wang, y otros, 2021)
S15	TcII	27,51	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)

<b>S154a</b>	TcII	19,27	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)
<b>S162a</b>	TcII	27,30	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)
<b>S23b</b>	TcII	28,13	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)
<b>S44a</b>	TcII	17,19	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)
<b>S92a</b>	TcII	27,08	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)
<b>Ycl2</b>	TcII	25,91	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)
<b>Ycl4</b>	TcII	26,14	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)
<b>Ycl6</b>	TcII	25,78	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)
<b>CL-Brener</b>	TcVI	36,03	2005	Whole-genome shotgun (WGS)	(El-Sayed, y otros, 2005)
<b>CL-Brener Esmeraldo-like</b>	TcVI	32,53	2005	Whole-genome shotgun (WGS)	(El-Sayed, y otros, 2005)
<b>Sylvio X10/1</b>	TcI	41,38	2017	PacBio/ Illumina	Versión original: (Franzén, y otros, 2011)
<b>Marinkellei B7</b>	Tcbat	38,65	2013	454/ Illumina HiSeq	(Franzén, y otros, 2012)
<b>JR cl. 4</b>	TcI	41,48	2012	Roche 454 FLX Titanium	-
<b>CL-Brener Non-</b>	TcVI	32,53	2005	Whole-genome shotgun (WGS)	(El-Sayed, y otros, 2005)

<b>Esmeraldo-like</b>					
<b>TCC</b>	TcVI	87,06	2018	PacBio	(Berná, y otros, 2018)
<b>Esmeraldo</b>	TcII	38,08	2012	Roche 454 FLX Titanium	-
<b>Dm28c</b>	TcI	53,27	2018	PacBio	(Berná, y otros, 2018)
<b>S11</b>	TcII	28,48	2018	Illumina Hiseq2000	(Reis-Cunha, y otros, 2018)

Tabla I. Cepas de *T. cruzi* cuyas genomas se encuentran disponibles en TriTrypDB.

#### 4.1.2 TcHMGB

La cepa no híbrida Dm28c presenta una copia del gen de la proteína TcHMGB (Gene ID: C4B63\_10g406), con una secuencia de 813 pb que codifica para una proteína de 270 aminoácidos. También se encuentra descrito en otras cepas de *T. cruzi* como Brazil A4, CL, CL-Brener (Non-Esmeraldo like y Esmeraldo like), G, marinkellei B7, TCC, Y C6 y SylvioX10/1.

#### 4.1.3 Localización genómica de TcHMGB

La secuenciación del genoma de *T. cruzi* Dm28c ha llevado al ensamblaje de contigs (Berná, 2018). El gen que codifica para la proteína TcHMGB se describió en el contigo 10 (longitud= 619240 pb) entre los 283466 – 284278 pb y se encuentra colindando a genes que codifican a la riboproteína pequeña nuclear U2 B (Gene ID: C4B63\_10g1625c) y una proteína putativa conservada (Gene ID: C4B63\_10g407), corriente arriba y corriente abajo, respectivamente.

Al estudiar la sintenia de la región genómica en la que se encuentra el gen estudiado, observamos que es conservada entre las distintas cepas de *T. cruzi* Brazil A4, CL-Brener (Non-Esmeraldo like y Esmeraldo like), TCC, Y C6 y SylvioX10/1.

En los demás tripanosomátidos, como *T. brucei* (gambiense y TREU927), *L. major* y *L. donovani*, la sintenia se pierde (Fig. 9).

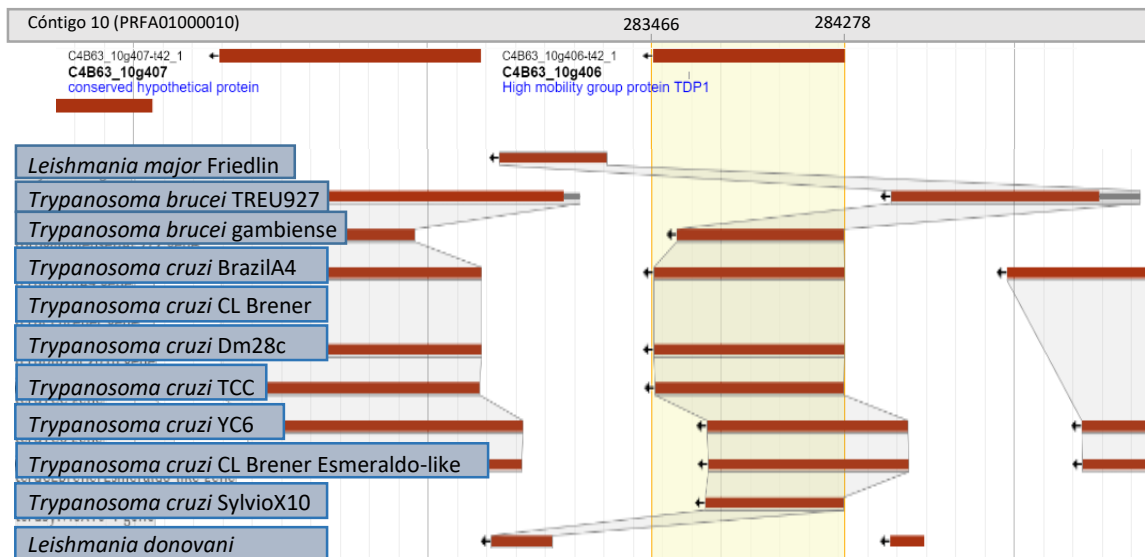


Figura 9. Sintonía de la proteína TcHMGB en la cepa Dm28c (Gene ID: C4B63\_10g406) respecto de la proteína HGMB en otros Tritryps. Adaptado de: (TritrypsDB, 2021)

#### 4.1.4 TcHMGB se expresa diferencialmente durante el ciclo de vida del parásito

En la base de datos, se encuentra una recopilación de datos obtenidos a partir de cuatro experimentos de transcriptómica llevados a cabo con *T. cruzi*.

El primero de estos trabajos, realizado por Minning y colaboradores, tuvo como objetivo determinar los límites en la regulación de la abundancia relativa de ARNm en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Estos análisis se efectuaron a partir de microarrays del genoma completo de la cepa Brazil (Tcl) de *T. cruzi* (Minning, 2009). Los datos proporcionados sobre los niveles de expresión del gen codificante de la proteína TcHMGB describen un mayor nivel en el estadio epimastigote del parásito, el siguiente en el estadio de tripomastigote metacíclicos y un menor nivel de expresión se evidencia en los tripomastigotes, respecto a lo obtenido en amastigotes (Fig. 10).

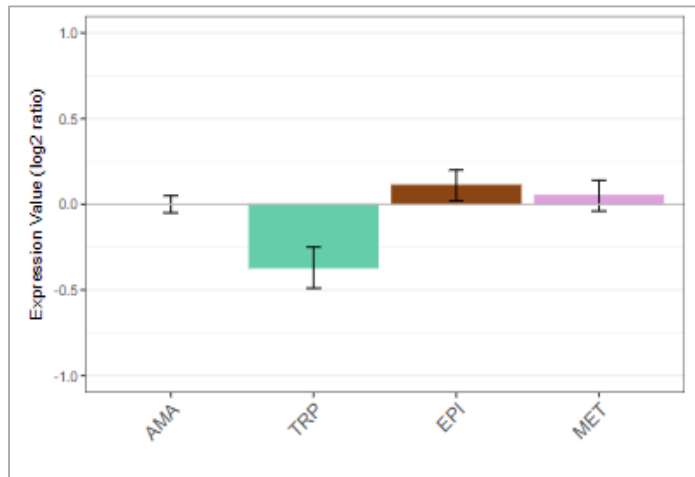


Figura 10. Niveles de expresión de TcHMGB en los cuatro estadios de vida del parásito *T. cruzi*: amastigotes, tripomastigotes, epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos obtenidos a partir de microarrays. Los valores de expresión en los distintos estadios se encuentran normalizados respecto a los valores obtenidos en amastigotes. Datos disponibles para el gen codificante de TcHMGB (GeneID: Tc00.1047053507951.114) descrito en la cepa CL-Brener Esmeraldo-like. Adaptado de: (TritrypDB, 2021).

El siguiente trabajo, llevado a cabo por Belew y colaboradores, tuvo como finalidad identificar los factores de virulencia expresados diferencialmente en la población de parásitos para entender las interacciones que ocurren entre el patógeno y el hospedador durante la infección que pueden llevar o no, a una patogénesis. Para analizar esta expresión diferencial, se compararon los perfiles de expresión llevados a cabo a partir de RNA-seq de dos cepas híbridas (TcVI) de *T. cruzi* que presentan un fenotipo virulento, CL-Brener y uno no virulento, CL-14, en modelos animales de infección. En cuanto a la expresión de la proteína TcHMGB, se observa que tanto en amastigotes como en tripomastigotes los niveles de transcritos leídos son más altos en CL-14 que en CL-Brener. A su vez, los niveles en tripomastigotes son menores que en amastigotes y en estos últimos, a las 60 horas pi se hallaron un mayor número de transcritos que a las 96 horas pi (Fig. 11.A) (Belew, 2017).

Por otro lado, Smircich y colaboradores, a partir de estudios de RNA-seq y “ribosome profiling” (Ribo-seq), buscaron evaluar la regulación entre el transcriptoma y el traductoma de la *T. cruzi* (cepa Dm28c) en estadios de vida no infectivos (epimastigotes) e infectivos (tripomastigotes metacíclicos) que cursa el parásito dentro del vector invertebrado. Al analizar los niveles de ARNm de TcHMGB, éstos resultaron ser mayores

en epimastigotes que en tripomastigotes, sin embargo, se observa que una menor cantidad de ARNm de TcHMGB se encontraba unido a ribosomas, lo que indicaría que habría algún tipo de regulación postranscripcional (Fig. 11.B) (Smircich, 2015).

Por último, mapas transcriptómicos de los estadios de vida infectivos en mamíferos de la cepa Y (TcII) *T. cruzi* fueron realizados por Li y colaboradores. Éstos se llevaron a cabo por RNA-seq, en simultáneo con el transcriptoma del hospedador humano a distintos tiempos de infección para comprender más acerca de la interacción del parásito con el hospedador. La proteína TcHMGB presenta el nivel más bajo de transcritos en el estadio tripomastigote, mientras que se detectan mayores niveles en los estadios proliferativos, especialmente en epimastigotes y amastigotes (entre las 24 y 72 horas pi) (Fig. 11.C) (Li, 2016).

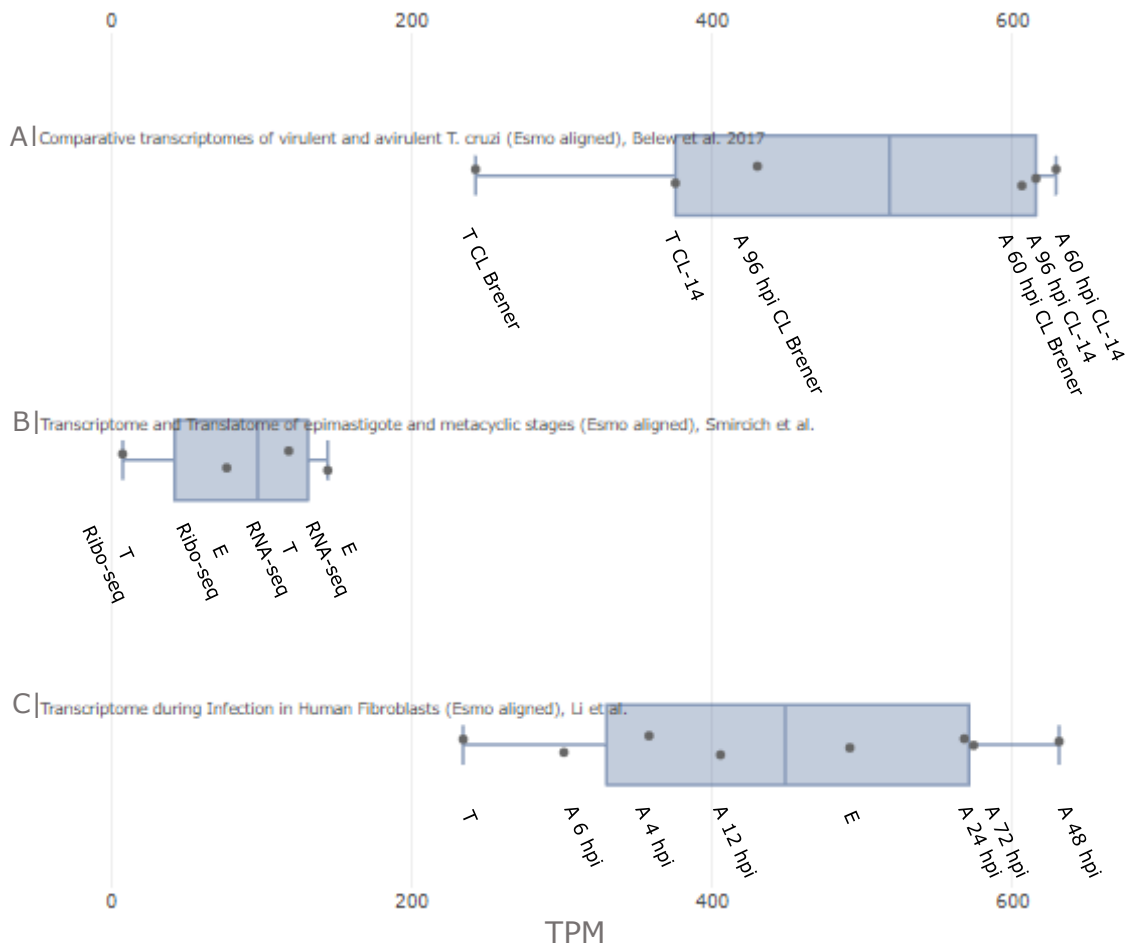


Figura 11. Resumen de los datos de transcriptómica de la proteína TcHMGB (GeneID: Tc00.1047053507951.114) disponibles en la base de datos, descrito en la cepa CL-Brener Esmeraldo-like. Cada punto negro representa un valor de expresión en la muestra obtenidos a partir de RNA-seq. En los

boxplot, las cajas representan la mediana y los cuartiles superior e inferior, y los bigotes muestran los valores máximos y mínimos. TPM= transcritos por millón de kilobases. T= tripomastigotes. A= amastigotes. E= epimastigotes. Adaptado de: (TritrypDB, 2021)

Los análisis proteómicos incluidos en la base de datos describen a la proteína en los distintos estadios de vida del parásito. La determinación del proteoma completo de los cuatro estadios de *T. cruzi* fue llevado a cabo por Atwood y colaboradores, mediante extractos proteicos de tripomastigotes, epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes metacíclicos de la cepa CL-Brener, separados y analizados por cromatografía líquida multidimensional seguida de cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masa en tandem (LC-MS/MS) (Atwood, 2005). La proteína TcHMGB fue detectada en los estadios amastigote, epimastigote y tripomastigote metacíclico.

A su vez, TcHMGB se encuentra caracterizada cuantitativamente por espectrometría de masa a partir del trabajo de Godoy y colaboradores, en el cual se buscó determinar el proteoma durante la metacicloogénesis en un modelo de infección *in vitro* y así, obtener una mejor comprensión de los cambios en el programa génico durante el proceso de diferenciación (de Godoy, 2012).

En epimastigotes sometidos a estrés nutricional durante dos horas respecto de los epimastigotes no hambreados se observa un aumento de unas dos veces en las cantidades de TcHMGB. No se evidenciaron cambios significativos de la proteína entre los estadios tempranos de la metacicloogénesis y las células adheridas durante 12 horas, sin embargo, hubo una disminución progresiva de la proteína de unas dos veces entre las células adheridas y los epimastigotes sometidos a estrés nutricional. En tripomastigotes metacíclicos, TcHMGB se halló en menores cantidades que en las etapas iniciales de la diferenciación (Fig. 12). Podríamos decir que TcHMGB responde a las señales de estrés con un incremento de su síntesis y se expresaría en mayores cantidades durante etapas tempranas de la metacicloogénesis, disminuyendo hacia el final del proceso de diferenciación.

*Estos trabajos concuerdan con los resultados obtenidos por Cribb y colaboradores, que reportan una mayor cantidad de la proteína TcHMGB en estadios proliferativos, epimastigotes y amastigotes, mientras que en tripomastigotes, la proteína es menos abundante (Fig. 13) (Cribb, 2011).*

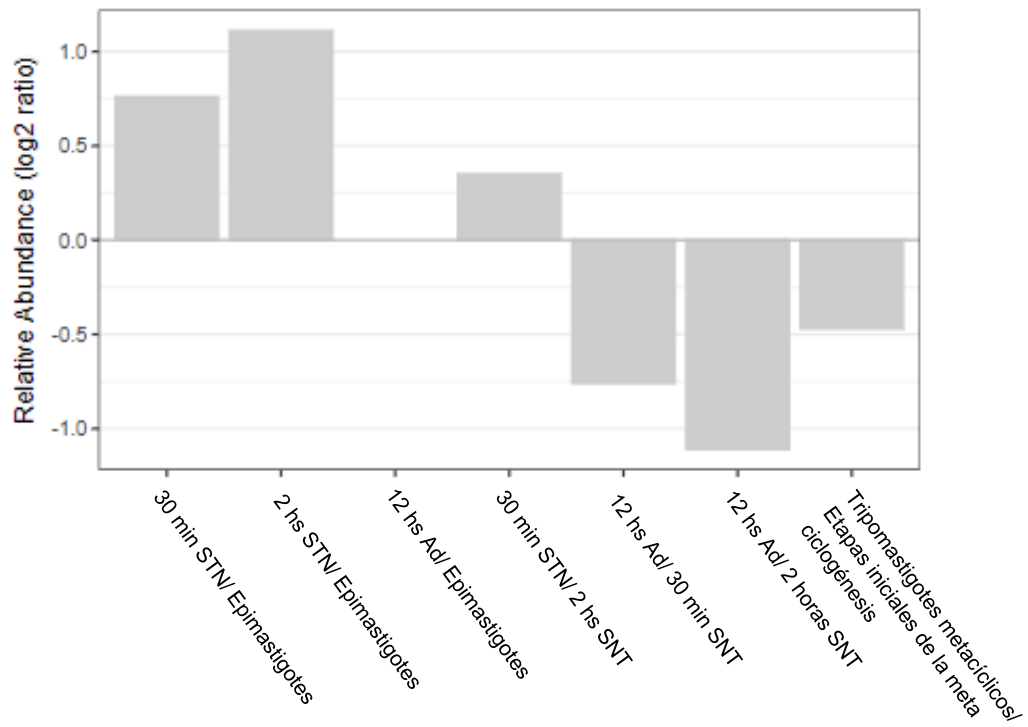


Figura 12. Variaciones de TcHMGB durante la metaciclogénesis. Los extractos proteicos analizados fueron obtenidos de estadios tempranos, intermedios y tardíos de la metaciclogénesis: epimastigotes, epimastigotes sometidos a 30 minutos de estrés nutricional (30 min STN), epimastigotes sometidos a dos horas de estrés nutricional (2 hs STN), células a las que se permitió adherirse durante 12 hs (12 hs Ad) y tripomastigotes metacíclicos. Los valores fueron obtenidos por espectrometría de masa. Adaptado de: (TritypDB, 2021)

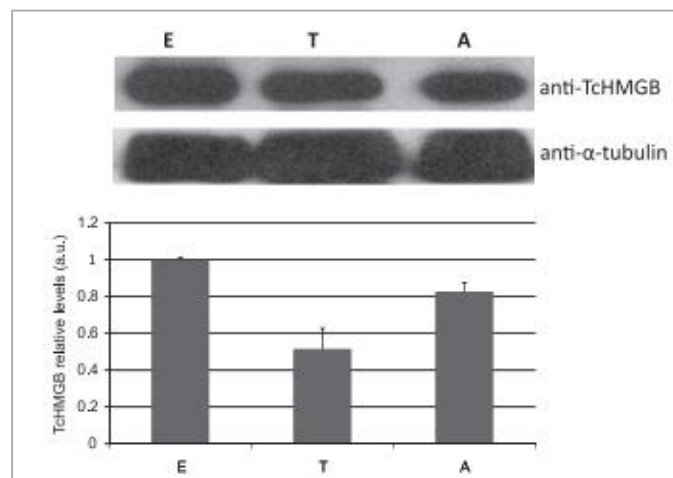


Figura 13. Detección de la proteína TcHMGB en extractos proteicos de los estadios epimastigote, tripomastigote y amastigote de *T. cruzi* a partir de un ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos anti-TcHMGB. Adaptado de: (Cribb, 2011).

#### 4.1.5 La proteína TcHMGB presenta dos dominios “HMG box” y un dominio “DEK-C terminal”

Como se describió en la sección 1.3.2, la proteína TcHMGB posee dos dominios HMG box en tándem y una secuencia de unos 110 aminoácidos en la región N-terminal. Esta última región es conservada entre los tripanosomátidos y parece ser única de los kinetoplastidos. Según las bases de datos Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) e InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) la región N-terminal contiene un dominio DEK-C terminal. En esta región N-terminal, también se encontraría la señal de localización nuclear (NLS) entre los aminoácidos 87-111, deducida utilizando el algoritmo ProteinPredict (<https://predictprotein.org/>) (Bernhofer, 2021).












Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias entre TcHMGB y proteínas de la familia HMGB utilizando ClustalOWS (Sievers & Higgins, 2018). Se pueden diferenciar cuatro regiones: la región N-terminal, los dos dominios HMG box y la región C-terminal (Fig. 14.A). La región N-terminal, solo se encuentra conservada entre los tripanosomátidos (52,72% entre *T. brucei* y *T. cruzi*, y 33,63% entre *Leishmania* y *T. cruzi*). En esta región, se localiza el dominio DEK-C terminal. En los organismos que presentan un único dominio HMG box, éste se alineó con el segundo HMG box de aquellas proteínas que contienen dos dominios en tándem, lo que sugiere que el dominio “HMG box b” es el más conservado en la familia. La región C-terminal de las proteínas HMGB de mamíferos suele contener una cola acídica rica en aspartato y glutamato, que también se observa en otros vertebrados como el pez teleostero *Danio rerio*. Sin embargo, esta región no está presente en organismos que solo poseen un HMG box como *Saccharomyces cerevisiae* o *Plasmodium falciparum*, ni en las secuencias de tripanosomátidos (la proteína de *Leishmania* tiene una región C-terminal más corta que la de mamíferos y rica en serina).



(HMGB1 de *Arabidopsis thaliana*), todas pertenecientes al grupo de ortología **OG6\_100324**. B. Estructura tridimensional de la proteína TcHMGB modelada por métodos computacionales por el proyecto AlphaFold (ID: AF-Q4D714-F1) (Jumper, 2021). Adaptado de: (EMBL-EBI, 2021)

Al comparar la arquitectura de dominios de TcHMGB y las proteínas de la familia HMGB estudiadas observamos que se encuentran dos tipos de dominios HMG box nombrados según PFAM como “HMG\_box” (ID: PF00505) y “HMG\_box\_2” (ID: PF09011) (Tabla II). Las proteínas MmHMGB1, DrHMGB1, HsHMGB1 y HsHMGB2 contienen estos dos dominios en tándem. En cambio, ambos dominios HMG box de los tripanosomátidos corresponden a un único tipo (ID: PF00505), al igual que las proteínas HMGB que contienen un único dominio HMG box en su estructura como las de *P. falciparum*, *S. cerevisiae* y *A. thaliana*. Otras proteínas ortólogas a TcHMGB presentan una amplia variedad de dominios adicionales a los dominios HMG box en su estructura como dominios involucrados en el simporte de sodio:sustrato (dominio SSF), en el control transcripcional dependiente de cromatina (dominio SAND), en interacciones específicas proteína-proteína (dominio WWE) y en la dinámica de microtúbulos, migración celular y segregación de cromosomas (dominio LisH), entre otros (OrthoMCL, 2021). (EMBL-EBI, 2021)

*Los dominios HMG box han sido encontrados en una gran variedad de proteínas de unión al ADN y en complejos involucrados en la remodelación de la cromatina. Estos dominios son capaces de unirse al ADN a través de mecanismos independientes de secuencia como los de la familia HMGB, o por especificidad de secuencia como ciertos factores de transcripción. Sin embargo, todos los dominios HMG box se unen a estructuras de ADN con alta afinidad y tienen la capacidad de curvarlo (Stros, 2007). En base a estos datos, la proteína TcHMGB sería una HMGB canónica al contener dos dominios HMG box en tándem como las HMGB de mamíferos y el dominio DEK-C terminal no afectaría su capacidad de curvar el DNA, característica fundamental de la familia de proteínas HMGB (Cribb, 2011).*

Proteína	Organismo	Tamaño	
ScNHP6A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	93 aa	
ScNHP6B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C	99 aa	
PfHMGB1	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	97 aa	
AtHMGB1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	178 aa	
DrHMGB1	<i>Danio rerio</i>	205 aa	
MmHMGB1	<i>Mus musculus</i> C57BL6J	215 aa	
HsHMGB1	<i>Homo sapiens</i>	215 aa	
HsHMGB3	<i>Homo sapiens</i>	200 aa	
TbHMGB	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> DAL972	271 aa	
LdHMGB	<i>Leishmania donovani</i> BPK282A1	302 aa	
TcHMGB	<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c 2018	270 aa	




Referencias			
Código	Dominio	Descripción	Símbolo
PFAM			
PF00505	HMG_box	HMG-box domain	
PF09011	HMG_box_2	HMG-box domain	
PF08768	DEK-C	DEK C terminal domain	

Tabla II. Representación de la arquitectura de dominios de TchMGB y proteínas pertenecientes a la familia HMGB de *T. brucei*, *L. donovani*, *H. sapiens*, *D. rerio*, *M. musculus*, *S. cerevisiae*, *P. falciparum*, *A. thaliana*. Adaptado de: (OrthoMCL, 2021)

#### 4.1.6 TchMGB: las modificaciones postraduccionales podrían afectar su localización y función

TritrypDB también incluye distintos algoritmos bioinformáticos que permiten predecir la localización celular de la proteína. La información brindada indica que TchMGB no posee dominios transmembrana o péptidos señal. Uno de estos algoritmos, “Big-Pi Predictor”, arrojó que TchMGB no poseería sitios C-terminales de anclaje GPI potenciales (Eisenhaber, 1999). Según MitoProt y WolfPsort, la proteína tiene bajas de probabilidades de ser encontrada en la mitocondria mientras que posee altas probabilidades de ser hallada en el núcleo de la célula y en menor proporción en el citoplasma (Claros & Vincens, 1996) (Horton, 2007).

Como se mencionó anteriormente en la sección 1.3.1, las proteínas de la familia HMGB se caracterizan por ser objeto de diferentes modificaciones postraduccionales (MPTs) que pueden afectar sus actividades y su localización (Bertheloot & Latz, 2016). Por esta razón, nos interesó analizar las posibles MPTs que sufre la proteína TchMGB y cómo influyen en su localización.

Dentro de los datos obtenidos a partir de experimentos proteómicos incluidos en la base de datos (Tabla III), tres MPTs fueron reportadas en *T. cruzi*: sumoilación, fosforilación y acetilación. Dos de éstas, la fosforilación y la acetilación junto a la metilación, a su vez afectaban a mHMGB1 alterando su localización. Teniendo en cuenta esto, decidimos predecir si estas MPTs también afectarían a TcHMGB utilizando distintos predictores bioinformáticos como: PAIL, NetPhos, Methyl-Pse AAC, MusiteDeep y GPS-SUMO (Tabla III).

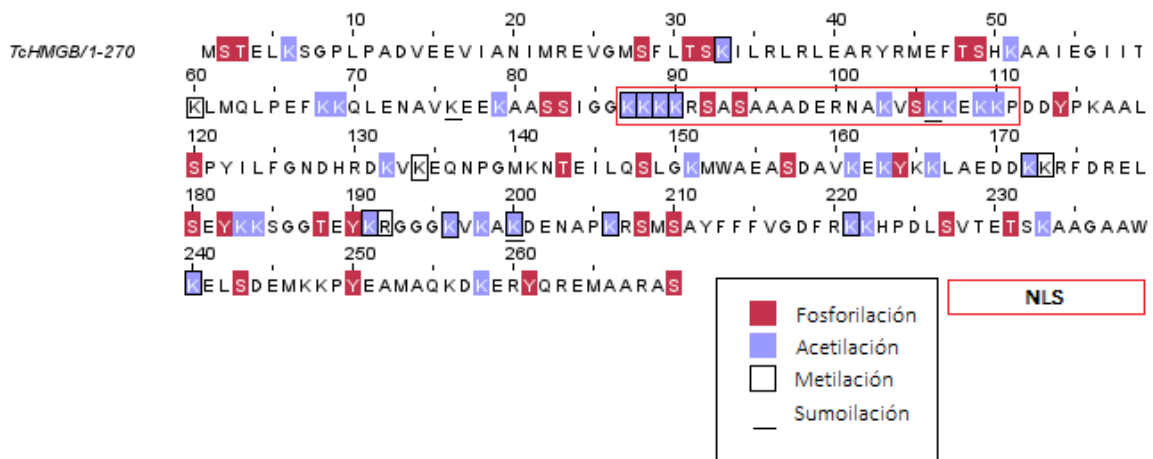


Figura 15. Sitios de modificación postraduccional predichos por algoritmos bioinformáticos detallados en la Tabla II, en la proteína TcHMGB. Se señala una señal de localización nuclear (NLS) hipotética deducida por ProteinPredict (<https://predictprotein.org/>) (Bernhofer, 2021).

La proteína TcHMGB también poseería sitios de acetilación, metilación, fosforilación y sumoilación (Fig. 15). Dentro del NLS, la proteína mHMGB1 contiene cinco lisinas que al ser hiperacetiladas, provocarían su relocalización al medio extracelular. En *T. cruzi*, la proteína TcHMGB contiene 9 lisinas que podrían ser acetiladas en el NLS predicho. Evidencias experimentales obtenidas previamente en nuestro laboratorio sugieren que la región N- terminal sería funcional y necesaria para su localización, al igual que la acetilación. No obstante, no sería la única MPT involucrada en su localización ya que TcHMGB es detectada en los sobrenadantes de células infectadas o epimastigotes y tripomastigotes no tratados con DACis (Cribb, 2017). En neutrófilos, la translocación citosólica de mHMGB1 dependería de la metilación de la Lys42, sin embargo, este residuo no se conserva en TcHMGB, en esta posición se encuentra una arginina. A su vez, TcHMGB contiene dentro del NLS predicho tres sitios de fosforilación que podrían

provocar la relocalización celular de la proteína, como ocurre en monocitos con mHMGB1.

Por otro lado, el estado rédox de la proteína mHMGB1 es un factor importante en la modulación de sus funciones extracelulares. Esto depende del estado de oxidación de tres cisteínas en las posiciones 23, 45 y 106 (Yang, 2012). Estas cisteínas no se encuentran conservadas en la proteína homóloga de *T. cruzi* por lo que su papel inflamatorio estaría regulado por otro tipo de MPTs, como las mencionadas anteriormente.

Modificaciones postraduccionales			
<b>Acetilación</b>	Predicción bioinformática	PAIL ( <a href="http://bdmpail.biocuckoo.org/">http://bdmpail.biocuckoo.org/</a> ). Algoritmo predictor de lisinas (K) acetiladas basado en una base de datos de 249 sitios de acetilación de 92 proteínas (Li, 2006).	
	Evidencia experimental	Proteómica comparativa de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> para el análisis de proteínas acetiladas utilizando lisados celulares, análisis de proteínas por espectrometría de masa (LC-MS/MS) y posterior análisis bioinformático (Schenkman, 2018).	
<b>Metilación</b>	Predicción bioinformática	Methyl-Pse AAC ( <a href="http://www.jci-bioinfo.cn/iMethyl-PseAAC">http://www.jci-bioinfo.cn/iMethyl-PseAAC</a> ). Algoritmo predictor de argininas (R) y/o lisinas (K) metiladas basado en propiedades fisicoquímicas, evolución de secuencias, bioquímica e información sobre desorden estructural (Qiu, 2014).	

		<p>MusiteDeep (<a href="https://www.musite.net/">https://www.musite.net/</a>).          Algoritmo predictor de sitios putativos que sufren diversas MPTs, entre ellas la metilación de lisinas y argininas (Wang, 2020).</p>	
<b>Fosforilación</b>	Predicción bioinformática	<p>NetPhos (<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</a>).          Algoritmo predictor de serinas (S), treoninas (T) y tirosinas (Y) fosforiladas de células eucariotas basado en sustratos de 17 quinasas genéricas y específicas (Blom, 1999).</p> <p>MusiteDeep (<a href="https://www.musite.net/">https://www.musite.net/</a>).          Algoritmo predictor de sitios putativos que sufren diversas MPTs, entre ellas la fosforilación de tirosinas, treoninas y serinas (Wang, 2020).</p>	3.1
	Evidencia experimental	<p>Fosfoproteoma de <i>T. cruzi</i> durante la metacicloogénesis. Los extractos proteicos fueron enriquecidos utilizando cromatografía TiO<sub>2</sub> y luego fueron analizados por espectrometría de masa de alta precisión, por último, con el uso de herramientas bioinformáticas se identificaron inequívocamente los sitios específicos de fosforilación (Marchini, 2011).</p>	

Sumoilación	Predicción bioinformática	<p>GSP-SUMO (<a href="http://sumosp.biocuckoo.org/online.php">http://sumosp.biocuckoo.org/online.php</a>). Algoritmo predictor lisinas sumoiladas basadas en estudios de sitios de sumoilación y motivos de SUMO-interacción (Zhao, 2014).</p> <p>MusiteDeep (<a href="https://www.musite.net/">https://www.musite.net/</a>). Algoritmo predictor de sitios putativos que sufren diversas MPTs, entre ellas la sumoilación de lisinas (Wang, 2020).</p>
	Evidencia Experimental	<p>Determinación de genes ortólogos de la vía de sumoilación en <i>T. cruzi</i> y funcionalidad de éstos en los parásitos activos. Identificación de sitios de sumoilación a partir de la generación de epimastigotes transfectantes de SUMO doblemente etiquetadas. Enriquecimiento de proteínas sumoilizadas por cromatografía de afinidad en tándem y análisis de esta muestra por espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida bidimensional (Bayona, 2011).</p>

Tabla III. Resumen de la evidencia experimental de MPTs identificadas en *T. cruzi* y predicciones bioinformáticas de las posibles modificaciones postraduccionales de la proteína TcHMGB.

En base a lo observado en modelos *in vitro* e *in silico* con TcHMGB, nos propusimos estudiar la proteína durante una infección *in vivo*, por lo que decidimos en un primer paso, caracterizar un modelo de infección animal con la cepa Dm28c de *T. cruzi*. Este modelo resulta de gran utilidad para nuestro grupo de laboratorio ya que además de la cepa salvaje, contamos con una amplia variedad de cepas transfectantes derivadas de Dm28c que solo han sido, hasta el momento, caracterizadas de forma *in vitro*.

## **4.2 Modelo de infección murino experimental de Chagas con la cepa Dm28c de *T. cruzi***

En el estudio de la infección con *T. cruzi* se han utilizado diversos modelos experimentales. En el modelo murino, distintas cepas de ratones difieren en la susceptibilidad o resistencia a la infección que dependen de una variedad de factores genéticos tanto del hospedador como del parásito (Trischmann & Bloom, 1982) (Andrade, 2002) (Santi-Rocca, 2017). Respecto a la cepa Dm28c, la cual es utilizada por nuestro grupo de trabajo una variedad de ensayos moleculares e *in vitro*, no contamos con un modelo animal caracterizado. Existen antecedentes de modelos de infección con esta cepa en ratones Swiss Webster descritos por Calvet y colaboradores, en los que se observó diferencias significativas en la mortalidad y en la parasitemia e infiltrados inflamatorios en tejidos cardiacos al ser infectados con la cepa Dm28c (Tcl) o con la cepa Y (Tcll) (Calvet, 2004).

### **4.2.1 La cepa Dm28c no resultó letal ni generó alteraciones físicas considerables en ratones BALB/c**

Con el fin de analizar este nuevo modelo animal, se realizaron experimentos de infección de ratones BALB/c machos de 6-8 semanas de vida, con tripomastigotes la cepa Dm28c de *T. cruzi* obtenidos de forma *in vitro* a partir de un modelo de infección de células Vero en monocapa.

En un primer experimento, nos propusimos determinar la dosis adecuada de parásitos para estudios posteriores. Para esto, ensayamos dos dosis distintas de parásitos inoculando a los animales con 1000 o 5000 parásitos/animal. Los parámetros evaluados fueron parasitemia, estado general, manifestaciones clínicas y mortalidad.

La cepa Dm28c en las dosis de inoculación analizadas no resultó letal, los animales no presentaron afecciones físicas evidentes ni se vio alterado su comportamiento durante el curso de la infección. Las parasitemias aumentaron desde el día 10 pi tanto en los ratones inoculados con 1000 y 5000 parásitos, alcanzando un pico entre los 21 y 14 días pi, respectivamente, luego disminuyeron hasta desaparecer completamente en la última evaluación a los 42 días postinfección (pi), cuando los animales fueron sacrificados. En el

pico se registraron en promedio 42,5 parásitos/50 campos microscópicos ( $6 \times 10^5$  parásitos/ml) en los animales infectados con 5000 parásitos/ratón y 31 parásitos/50 campos microscópicos ( $4,3 \times 10^5$  parásitos/ml) en los infectados con 1000 parásitos (Fig. 16).

En el modelo de infección descrito por Calvet et al 2004, con ratones Swiss Webster, se utilizó una dosis de 100 parásito/ratones para la primoinfección provenientes de un modelo de infección *in vitro*. La parasitemia alcanzó un pico de  $4 \times 10^5$  parásitos/ml a los 23 días pi y luego, disminuyó hasta volverse indetectable a los 42 días pi. Al compararlo con nuestro modelo, inóculos 10 y 50 veces más grande generaron picos de parasitemia solo unas 1-1,5 veces mayores que los observados en ratones Swiss. Sin embargo, ambos modelos, presentan curvas de parasitemia típicas de la cepa Dm28c.

*Considerando que no observamos diferencias significativas entre las dos dosis de inoculación, y por una mayor facilidad y riesgo en la manipulación y obtención de un número menor de parásitos, se eligió la dosis de 1000 parásitos/ratón para los experimentos posteriores.*

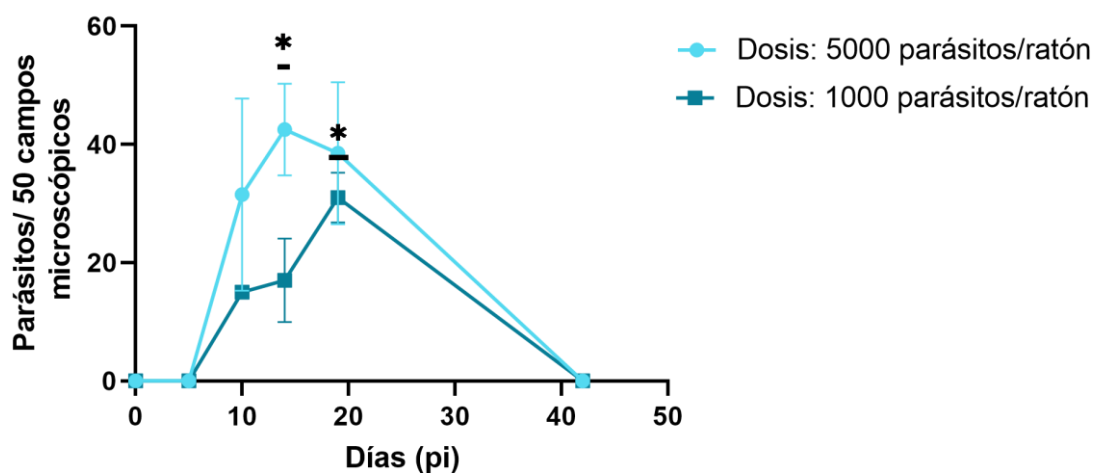


Figura 16. Curvas de parasitemia correspondientes a las dosis de inoculación estudiadas: 1000 y 5000 parásitos/ratón. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=4/grupo). Los datos se evaluaron mediante análisis ANOVA one way y test de multiples comparaciones Tuckey. \*p<0,05

En un segundo experimento, infectamos con 1000 parásitos cada animal y determinamos los mismos parámetros que en el experimento anterior: parasitemia, sobrevida, estado

general y manifestaciones clínicas del animal. Se determinó el peso del bazo de los animales sacrificados a lo largo de la infección, los cuales mostraron buena correlación con los niveles de parasitemia. Los tejidos cardíacos y los bazos fueron analizados para evaluar la gravedad de la miocarditis y la esplenomegalia causadas por la infección respectivamente.

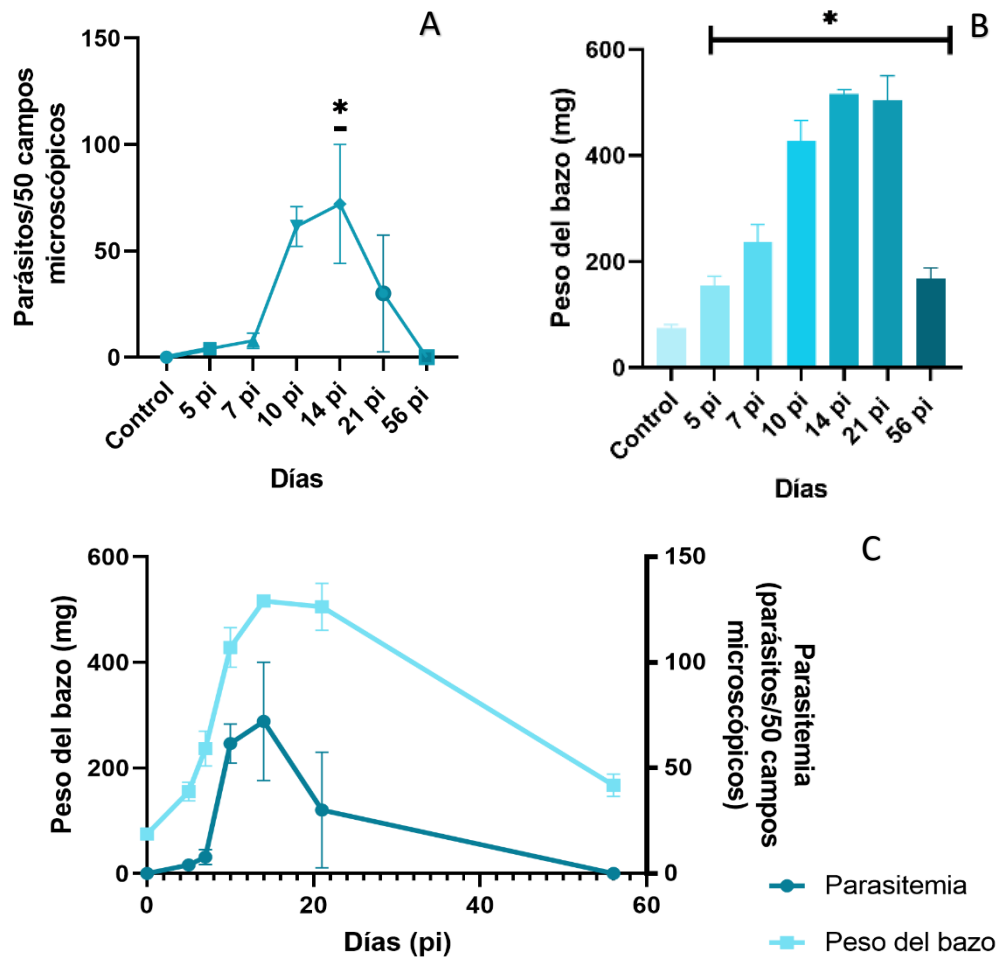


Figura 17. A. Curva de parasitemia obtenida en el segundo experimento al inocular los ratones con 1000 parásitos/ratón de la cepa Dm28c de *T. cruzi*. B. Variaciones en el peso del bazo durante la infección. C. Gráfico donde se muestra las curvas de parasitemia y cambios en el peso del bazo durante el curso de la infección. Los datos se expresan como media±SEM (n=3-6/grupo). Los datos se evaluaron mediante análisis ANOVA one way y test de múltiples comparaciones Tuckey. \*p<0,05

Nuevamente, como era de esperar, la infección no resultó letal para los animales y presentaron un buen estado general en el tiempo transcurrido. El pico de parasitemia se determinó en el día 14 pi, alcanzando un valor detectado máximo de 72 parásitos/ 50

campos microscópicos ( $10,1 \times 10^5$  parásitos/ml) y luego, disminuyó hasta volverse nula a los 56 días pi (Fig. 17.A). Por otro lado, analizamos el peso del bazo, el cual está implicado en la respuesta inmunológica. El peso del bazo presentó un comportamiento semejante al de la parasitemia, se incrementó abruptamente hasta los 14 días pi y luego disminuye tras superar el pico de parasitemia (Fig. 17C).

*Estos hallazgos resultaron menos severos que los descritos en modelos de infección con ratones C57BL/6 y BALB/c inoculados con 100 parásitos/ratón de la cepa Tulahuén, caracterizados por nuestro grupo de laboratorio (Roggero, 2002). El pico de parasitemia en ambos modelos fue observado a los 21 días pi. Los ratones C57BL/6 presentaron una mortalidad del 100% entre los 21 y 25 días pi, mientras que un 60 % de los BALB/c superaron la fase aguda. A su vez, el peso de los animales disminuyó, lo cual es considerado un signo de desmejoría general. En cambio, una patogenicidad similar a la hallada en el modelo estudiado, fue desarrollada por la cepa Dm28c en los ratones Swiss, los cuales sobrevivieron a la fase aguda de la infección experimental tras ser monitoreados durante 77 días sin presentar alteraciones en su peso (Calvet, 2004). En base a estas observaciones, proponemos que la cepa Dm28c podría ser utilizada como ejemplo de cepa no virulenta y el modelo caracterizado sería útil como modelo alternativo de infección.*

#### **4.2.2 La infección produjo un aumento en el tamaño del bazo**

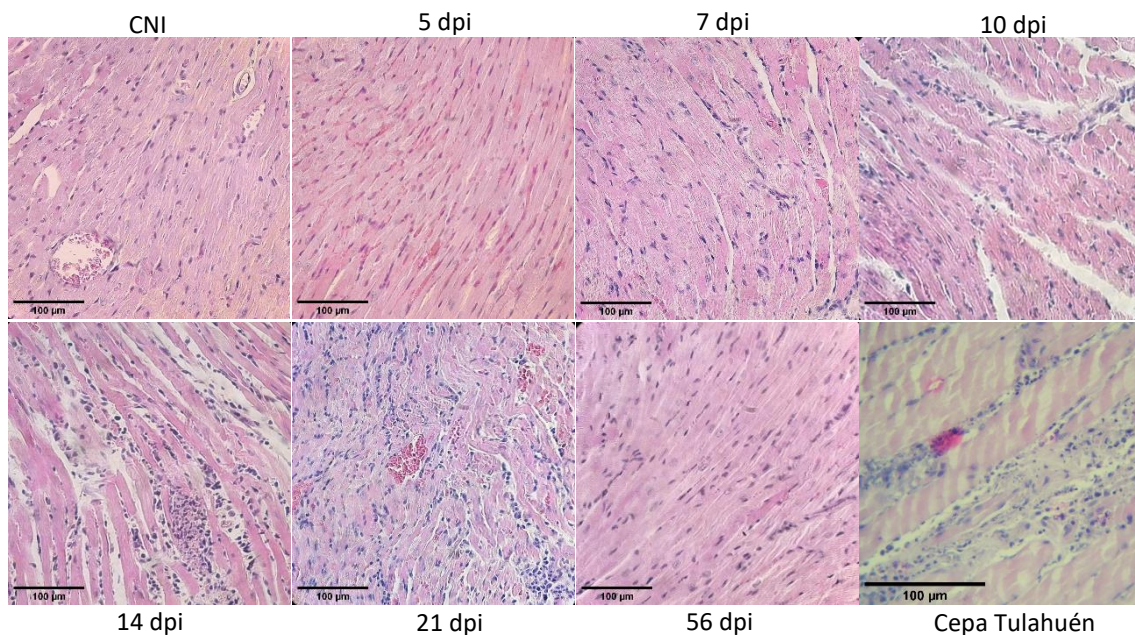
La esplenomegalia es el aumento de tamaño del bazo que pueden estar causada por distintas infecciones y enfermedades. La enfermedad de Chagas promueve esta condición en humanos y en ratones. Reportes indican que los esplenocitos son células fundamentales en la respuesta inmune del hospedador, ya que ratones BALB/c a los cuales se les extirpó el bazo previo a la infección con parásitos de la cepa Dm28c de *T. cruzi* presentaron una mayor susceptibilidad a la infección (Morrot, 2009).

Esta afección se evidenció en los animales infectados desde el día 5 pi. El peso del bazo de los ratones infectados sufrió un incremento de unas 6 veces respecto al control no infectado en los días 14 y 21 pi, y luego, hacia día 56 pi se observó una disminución estadísticamente significativa (Fig. 17B). Las variaciones observadas en el peso del bazo indicarían que la cepa Dm28c podría promover en los animales la activación y expansión clonal de linfocitos T/B, involucrados en el control de la carga parasitaria.

### 4.2.3 La infección parasitaria generó miocarditis aguda durante la fase aguda y luego disminuyó considerablemente

Al analizar los tejidos cardíacos observamos que la infección generó cardiopatías con infiltrados inflamatorios difusos. Estos estados se vuelven notorios desde el día 7, en el que células mononucleares comienzan a acumularse en los espacios intersticiales progresivamente a medida que avanza la infección. Los infiltrados intensos fueron hallados los días 14 y 21 pi, y luego disminuyeron hasta volverse escasos en el día 56 pi, similares a los observados en el quinto día pi (Tabla IV). A su vez, estos infiltrados inflamatorios resultan difusos y su distribución parece ser uniforme en todos los campos observados (Fig. 18, panel superior).

Los nidos de amastigotes, en concordancia con lo observado con los infiltrados inflamatorios, fueron hallados en los días 10, 14 y 21 pi cuando la reacción inflamatoria se vuelve más intensa. Los nidos en su mayoría presentaron un tamaño pequeño, sin embargo, se encontraron unos pocos de un tamaño mayor (Fig. 18, panel inferior).



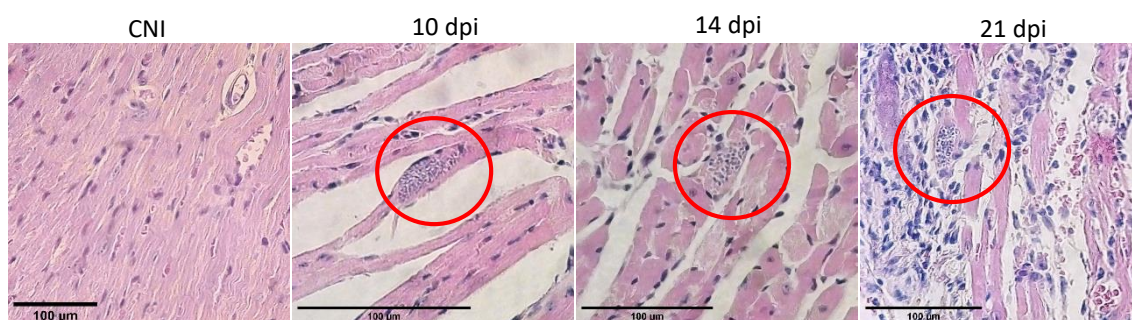


Figura 18. Miocarditis aguda. En ambos paneles se muestran cortes histopatológicos de tejido cardíaco teñidos con hematoxilina-eosina. En el panel superior, se observan los cortes histopatológicos obtenidos de ratones BALB/c infectados con 1000 tripomastigotes/animal de la cepa Dm28 de *T. cruzi*, en los cuales infiltrados inflamatorios difusos fueron evidenciados desde el día 5 al 56 postinfección (CNI-56 dpi). A su vez, se muestran infiltrados focales encontrados en el día 14 postinfección en tejidos cardíacos de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén (Datos previos de nuestro grupo: (Roggero, 2002)). En el panel inferior se observan nidos de amastigotes hallados en los tejidos cardíacos de los animales infectados con la cepa Dm28c en los días 10, 14 y 21 postinfección se encuentran señalados con círculos rojos en el panel inferior. (CNI= control no infectado; dpi= días postinfección). (n=3-5/grupo).

Días (pi)	Score	Nidos de amastigotes
<b>Control no infectado</b>	Ausencia	Ausencia
<b>5</b>	Escaso	Ausencia
<b>7</b>	Leve	Ausencia
<b>10</b>	Moderado	Presencia
<b>14</b>	Intenso	Presencia
<b>21</b>	Intenso	Presencia
<b>56</b>	Escaso	Ausencia

Tabla IV. Score determinado en base al tipo y número de focos inflamatorios presentes en ambos ventrículos en ratones BALB/c infectados con 1000 tripomastigotes/animal de la cepa Dm28c de *T. cruzi* (promedio de 6 campos 10x por sección, 3/4 secciones por animal, 5-21 días pi (n=3/grupo); CNI-56 días pi (n=6/grupo)). (Días (pi)= días postinfección).

Los infiltrados inflamatorios difusos hallados resultaron singulares en comparación a los observados en cortes histológicos de tejido cardíaco de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con la cepa Tulahuén los cuales presentaron infiltrados inflamatorios focales definidos y localizados a los 14 días pi. En este estadio, también se localizaron nidos de

amastigotes (Roggero, 2002). Estas diferencias sugieren que diferentes cepas generan distintas respuestas en tejidos cardiacos (Henriques, 2014).

### **4.3 Evaluación de la especificidad de los anticuerpos anti-mHMGB1**

#### **4.3.1 La proteína del parásito no es reconocida por los anticuerpos anti-mHMGB1 de mamífero**

Como detallamos anteriormente, las proteínas TcHMGB y mHMGB1 contienen en su estructura dos dominios HMG box característicos de esta familia de proteínas. Estas proteínas presentan un 43,1% de identidad y un 53,6% de similitud entre las regiones que contienen a los dominios HMG box, es por esto que resultó de nuestro interés analizar la especificidad en el de los anticuerpos específicos del parásito y de mamífero para evitar posibles imprecisiones en ensayos posteriores. Para evaluar estos anticuerpos, en ambos casos, se realizaron pruebas de Western Blot.

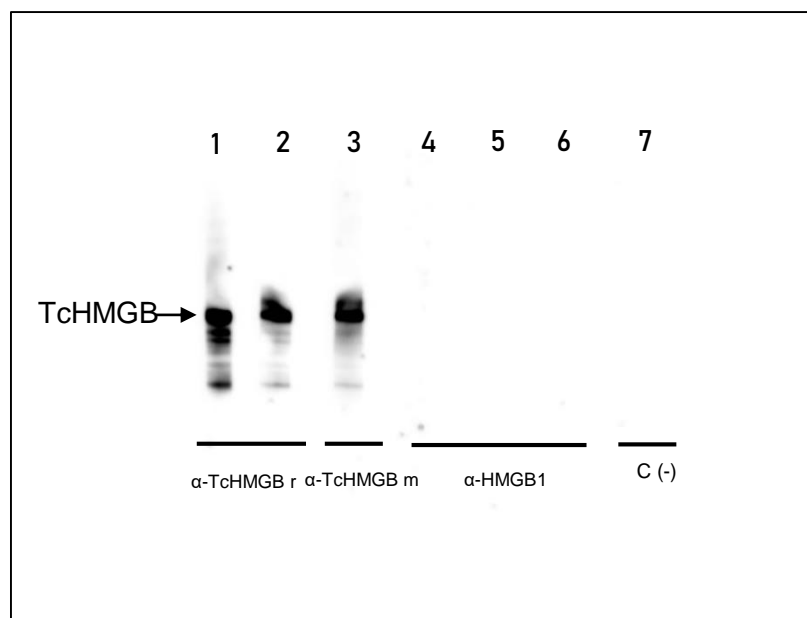


Figura 19. Prueba de especificidad de anticuerpos anti-HMGB1. Se enfrentó a la proteína TcHMGB a anticuerpos anti-TcHMGB obtenidos en conejo ( $\alpha$ -TcHMGB r) (Calle 1 y 2), en ratón ( $\alpha$ -TcHMGB m) (Calle 3), y a anticuerpos anti-HMGB1 ( $\alpha$ -HMGB1). (C-=control negativo, sin anticuerpo primario)

En un primer ensayo, evaluamos la especificidad de los anticuerpos anti-mHMGB1 (Fig. 19). La proteína TcHMGB es reconocida por los anticuerpos anti-TcHMGB, tanto los obtenidos en conejo como los de ratón (Calle 1-3). Los anticuerpos comerciales (Abcam, Estados Unidos) anti-HMGB1 de mamíferos (líneas 4-6) no reconocerían a la proteína del parásito.

En un segundo ensayo, con el fin de detectar a la proteína mHMGB1 y evaluar la afinidad de los anticuerpos anti-mHMGB1, partimos de un experimento de estimulación de células Raw 264.7. Como detallamos anteriormente en la sección 1.3.1, la proteína mHMGB1 es una proteína nuclear, pero ante señales de estrés causadas por daño o injuria celular, es liberada al medio extracelular donde promueve la activación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Pasheva & Ugrinova, 2016). Se realizaron tres tratamientos con el fin de estimular la secreción de mHMGB1 en células Raw de mamífero: adicionando LPS, TcHMGB y tripomastigotes. Luego, buscamos localizarla en el medio extracelular (sobrenadante) y en el medio intracelular (extractos celulares).

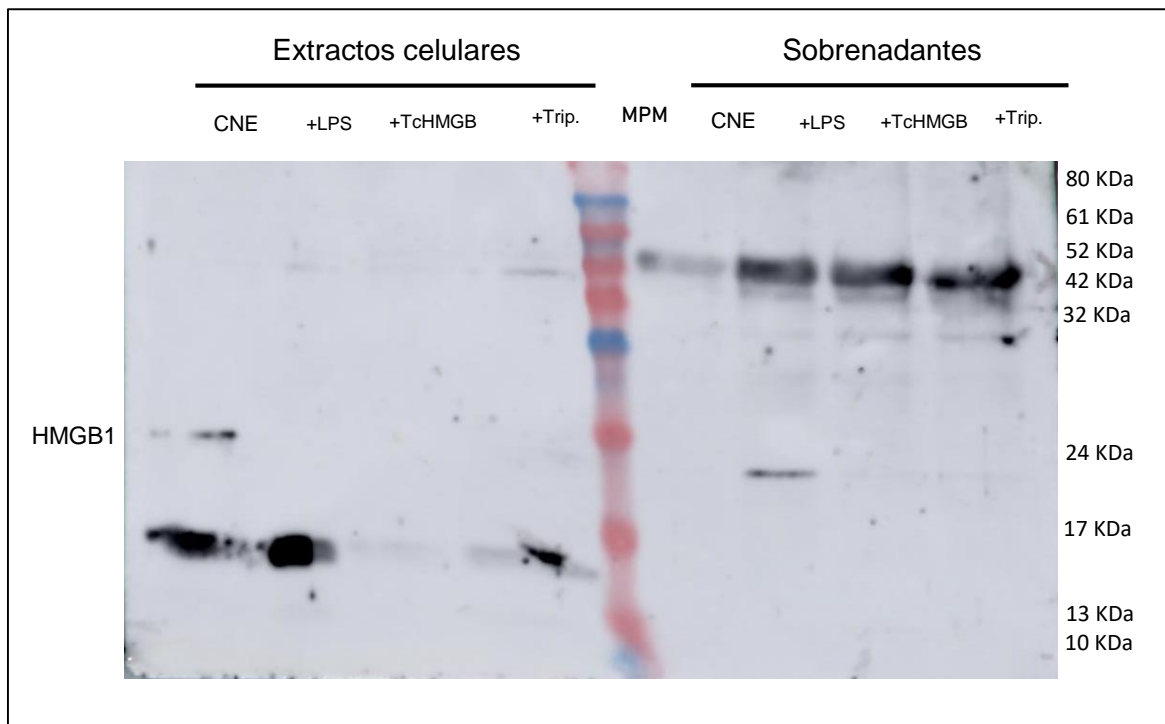


Figura 20. Experimento de estimulación de células de mamífero Raw 264.7 para la secreción de HMGB1. Se analizó la presencia de la proteína mHMGB1 en sobrenadantes (derecha) y en extractos celulares (izquierda) de un cultivo de células Raw 264.7 en las mismas cuatro condiciones: control sin estimular (CNE), con el agregado de LPS (+LPS), TcHMGB (+TcHMGB) y de tripomastigotes de *T. cruzi* (+Trip.). La

proteína se evidenció con el reconocimiento del anticuerpo anti-mHMGB1. (MPM= marcador de peso molecular).

Los anticuerpos anti-mHMGB1 reconocen específicamente a la proteína de mamífero. La proteína mHMGB1 (PM= 25KDa) se detectó con mayor intensidad en los extractos celulares de células no estimuladas y en los sobrenadantes de células estimuladas con el agregado de LPS (Fig. 20). Lo que significaría que la proteína en condiciones normales es hallada intracelularmente, mientras que, al percibir la célula, una señal de alerta, es liberada al medio extracelular. Es posible que en las demás condiciones también sea secretada pero que la estimulación no haya sido lo suficientemente en concentración y tiempo. Por otro lado, fueron detectadas inespecificidades en los sobrenadantes de células Raw, que suponemos que pueden deberse a proteínas abundantes presentes en el suero fetal bovino (FCS) suplementado en el medio de cultivo.

*Los resultados obtenidos confirman que los anticuerpos comerciales anti-mHMGB1 podrán ser utilizados para detectar la proteína del hospedador mamífero en modelos de infección in vitro o in vivo, sin que la proteína del parásito interfiera. Sin embargo, estos resultados no descartan que los anticuerpos anti-TcHMGB puedan dar reactividad cruzada con las proteínas mHMGB, pruebas que deberemos realizar en un futuro para continuar con la caracterización de la proteína TcHMGB en modelos in vivo e in vitro.*

## 5 Conclusiones

Las proteínas pertenecientes a la familia HMGB se caracterizan por contener dominios de unión al ADN de tipo HMG box, los cuales pueden estar presentes como único dominio o en hasta seis copias. Dentro del núcleo, se desenvuelven actuando como factores de transcripción o como remodeladores de la cromatina. En base a los análisis bioinformáticos realizados en este trabajo y a resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo, hemos catalogado a la proteína HMGB de *T. cruzi* como una proteína HMGB canónica, un subgrupo de proteínas asociadas a la cromatina que se caracterizan por contener invariablemente dos dominios HMG box en tándem que se unen al ADN con limitada especificidad de secuencia (Bustin, 2001).

Por otro lado, diferencias en los niveles de expresión de la proteína TcHMGB en los distintos estadios de vida del parásito fueron evidenciadas en ensayos de transcriptómica proporcionados por la base de datos TriTrypDB, lo cual estaría relacionado con los cambios en la estructura de la cromatina a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi*. Los niveles de expresión más elevados de TcHMGB fueron observados en estadios proliferativos: epimastigotes y amastigotes, en los que la cromatina se encuentra más laxa, mientras que, en estadios no proliferativos, en los que la cromatina se halla más compacta, los niveles de expresión de TcHMGB disminuyen. Los niveles de ARNm coinciden con los niveles de proteína reportados en estudios proteómicos. Teniendo en cuenta su capacidad de alterar la estructura del ADN, es muy probable que TcHMGB esté involucrada en el reordenamiento de la estructura afectando así a los distintos procesos nucleares como la transcripción, reparación del ADN y replicación.

Resultados prometedores se obtuvieron a partir de ensayos *in silico*, los cuales han predicho la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) que sería modificada postraduccionalmente, esperaríamos que tal como se observa en la proteína homóloga de mamíferos HMGB1, afectaran su localización celular. Si bien ensayos preliminares muestran que la ausencia de la región de la proteína que contienen al NLS o tratamientos con inhibidores de desacetilasas, afectan la localización celular de TcHMGB, un análisis mutacional debe llevarse a cabo para confirmar si esta región está involucrada en la relocalización de TcHMGB.

Para estudiar el comportamiento de TcHMGB y mHMGB1 *in vivo*, caracterizamos un modelo de Chagas murino experimental infectando ratones BALB/c con la cepa Dm28c de *T. cruzi*. Este modelo presentó un curso de infección con elevadas parasitemias y afección cardíaca y esplénica, los cuales evolucionaron favorablemente tras superar el pico de parasitemia. Al compararlo con el modelo de infección utilizando la cepa Tulahuén, esta cepa resulta menos virulenta, demostrando la gran variabilidad entre cepas de *T. cruzi*. Este modelo será de gran utilidad para estudiar el fenotipo de cepas transfectantes derivadas de Dm28c construidas en nuestro laboratorio como la cepa (Dm28/pTcINDEX/TcHMGB) la cual es capaz de sobreexpresar TcHMGB mediante inducción con Tetraciclina.

Si bien por cuestiones de tiempos, no se pudieron realizar las detecciones de la proteína TcHMGB *in vivo*, se realizó la prueba de especificidad de los anticuerpos comerciales anti-mHMGB1 y se determinó que no reconocerían inespecíficamente a la proteína del parásito, por lo que serán útiles para el reconocimiento de mHMGB1 en las muestras sin interferencias generadas por TcHMGB. En ensayos futuros, deberemos analizar la especificidad de los anticuerpos anti-TcHMGB para luego estudiar la modulación de TcHMGB y mHMGB1 durante el curso de infección en el modelo caracterizado y avanzar en la determinación de la presencia de la proteína TcHMGB o de anticuerpos anti-TcHMGB en sueros de humanos para diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

## ANEXO

Durante la caracterización del modelo de infección de ratones BALB/c con la cepa Dm28c de *T. cruzi*, se evaluó el estado general y las manifestaciones clínicas en los animales al cursar este tipo de infección parasitaria que se muestran en la Figura 21. En este trabajo, los animales no presentaron ninguna de estas manifestaciones clínicas y no mostraron diferencias entre el grupo infectado y el grupo control.

Manifestaciones clínicas	
Normal	
Piloerección	
"hunchback"	
Afectación ocular	
Disminución del movimiento	
Diarrea	

Figura 21. Manifestaciones clínicas que pueden presentar los animales al cursar una infección con *T. cruzi*.

## 6 Bibliografía

- Abrahamsohn, I. A., da Silva, A. P., & Coffman, R. L. (2000). Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity*, *68*(4), 1975–1979.
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, *4*, 499–511.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, *124*, 783–801.
- Altamura, F., Rajesh, R., Catta-Preta, C. M., Moretti, N. S., & Cestari, I. (2020). The current drug discovery landscape for trypanosomiasis and leishmaniasis: Challenges and strategies to identify drug targets. *Drug Dev Res.*, 1-28.
- Andrade, L. O., Machado, C. R., Chiari, E., Pena, S. D., & Macedo, A. M. (2002). *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol.*, *100*(4), 269-275.
- Annunziato, F., & Romagnani, S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+T cells. *Arthritis Research & Therapy*, *11*(257).
- Aslett, M. A.-F. (2010). riTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan;38(Database issue):D457-62. *Nucleic Acids Res.*, *38*, D457-62.
- Aslett, M. C., Aurrecochea, M., Berriman, J., Brestelli, B. P., Brunk, M., Carrington, D. P., . . . Li, F. (2010). riTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan;38(Database issue):D457-62. *Nucleic Acids Res.*, *38*, D457-62.
- Atwood 3rd, J., Weatherly, D., Minning, T., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F., . . . Tarleton, R. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, *309*(5733), 473-476.
- Bafica, A., Costa Santiago, H., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R., & Sher, A. (2006). Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent

- Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Immunol*, 177(6), 3515-3519.
- Baptista, R. P., Reis-Cunha, J. L., DeBarry, J. D., Chiari, E., Kissinger, J. C., Bartholomeu, D. C., & Macedo, A. M. (2018). Assembly of highly repetitive genomes using short reads: the genome of discrete typing unit III *Trypanosoma cruzi* strain 231. *Microb Genom.*, 4(4), e000156.
- Bayona, J. C., Nakayasu, E. S., Laverrière, M., Aguilar, C., Sobreira, T. J., Cho, H., . . . Alvarez, V. E. (2011). SUMOylation Pathway in *Trypanosoma cruzi*: Functional Characterization and Proteomic Analysis of Target Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10, 1-13.
- Belew, A. T., Junqueira, C., Rodrigues-Luiz, G. F., Valente, B., Oliveira, A. E., Polidoro, R. B., . . . Teixeira, S. M. (2017). Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. *PLoS Pathog*, 13, 12.
- Berná, L., Rodriguez, M., Chiribao, M. L., Parodi-Talice, A., Pita, S., Rijo, G., . . . Robello, C. (2018). Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microb Genom.*, 4(5), e000177.
- Bernhofer, M., Dallago, C., Karl, T., Satagopam, V., Heinzinger, M., Littmann, M., . . . Rost, B. (2021). PredictProtein - Predicting Protein Structure and Function for 29 Years. *Nucleic Acids Res*, 49(W1), W535-W540.
- Bertheloot, D., & Latz, E. (2016). HMGB1, IL-1 $\alpha$ , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cellular & Molecular Immunology*, 13, 1-22.
- Bertheloot, D., & Latz, E. (2017). HMGB1, IL-1 $\alpha$ , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol*, 14, 43-64.
- Bianchi, M. E., & Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(5), 496-506.

- Blom, N., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*, *294*(5), 1351-1362.
- Bradwell, K. R., Koparde, V. N., Matveyev, A. V., Serrano, M. G., Alves, J. M., Parikh, H., . . . Buck, G. A. (2018). Genomic comparison of *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* to *Trypanosoma cruzi* strains of high and low virulence. *BMC Genomics*, *19*(1), 770.
- Brener, Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 389-396.
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(8), e0004792.
- Brenière, S. W. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory . *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(8), e0004792.
- Bustin, M. (2001). Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci.*, *26*(3), 152-153.
- Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2018). Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi* Strain Bug2148. *Genome Announc.*, *6*(3), e01497-17.
- Callejas-Hernández, F., Rastrojo, A., Poveda, C., Gironès, N., & Fresno, M. (2018). Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. *Sci Rep.*, *8*(1), 14631.
- Calvet, C. M., Meuser, M., Almeida, D., Meirelles, M. N., & Pereira, M. C. (2004). *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp Parasitol.*, *107*(1-2), 20-30.
- CDC. (11 de Febrero de 2019). *Tripanomiasas americana*. Obtenido de Centro para el Control y Prevención de Enfermedades: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/>

- Claros, M. G., & Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem*, *241*, 770-786.
- Coura, J., & Viñas, P. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, *465*(7301), S6-7.
- Cribb, P. P.-P.-C.-P. (2017). Trypanosoma cruzi High Mobility Group B (TcHMGB) can act as an inflammatory mediator on mammalian cells. *PLoS Negl Trop Dis*, *11*(2), e0005350.
- Cribb, P., Perdomo, V., Alonso, V. L., Manarin, R., Barrio-Payan, J., Marquina-Castillo, B., . . . Hernández-Pandó, R. (2017). Trypanosoma cruzi High Mobility Group B (TcHMGB) can act as an inflammatory mediator on mammalian cells. *PLoS Negl Trop Dis*, *11*(2), e0005350.
- Cribb, P., Perozzi, M., Villanova, G. V., Trochine, A., & Serra, E. (2011). Characterization of TcHMGB, a high mobility group B family member protein from Trypanosoma cruzi. *International Journal for Parasitology*, *41*, 1149–1156.
- Cribb, P., Perozzi, M., Villanova, G. V., Trochine, A., & Serra, E. (2011). Characterization of TcHMGB, a high mobility group B family member protein from Trypanosoma cruzi. *International Journal for Parasitology*, *41*, 1149–1156.
- De Bona, E., Freitas Lidani, K. C., Bavia, L., Omidian, Z., Gremski, L. H., Sandri, T. L., & de Messias Reason, I. J. (2018). Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? *Frontiers in immunology*, *9*, 1842.
- de Godoy, L. M., Marchini, F. K., Pavoni, D. P., Rampazzo Rde, C., Probst, C. M., Goldenberg, S., & Krieger, M. A. (2012). Quantitative proteomics of Trypanosoma cruzi during metacyclogenesis. *Proteomics*, *12*(17), 2694-2703.
- de Souza, W. (1999). A short review on the morphology of Trypanosoma cruzi: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *94*(1), 17-36.
- de Souza, W. (2002). Basic cell biology of Trypanosoma cruzi. *Curr Pharm Des.*, *8*(4), 269-285.

- de Souza, W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(1), 89-100.
- Dvorak, J., Hall, T., & Crane, M. (1982). *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J. Protozool*, 29, 430-437.
- Eisenhaber, B. B. (1999). Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *JMB*, 292(3), 741-758.
- Eisenhaber, B., Bork, P., & Eisenhaber, F. (1999). Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *JMB*, 292(3), 741-758.
- El-Sayed, N. M., J., M. P., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., .., . . . P., A. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), 409-415.
- EMBL-EBI. (2021). AlphaFold. Obtenido de <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q4D714>
- Enright, M., & Spratt, B. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, 7(12), 482-487.
- Ferrer, E. (2015). TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS . *Saber*, 27(3), 359-371.
- Franzén, O., Ochaya, S., Sherwood, E., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Miles, M. A., & Andersson, B. (2011). Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. *PLoS Negl Trop Dis.*, 5(3), e984.
- Franzén, O., Talavera-López, C., Ochaya, S., Butler, C. E., Messenger, L. A., Lewis, M. D., . . . Andersson, B. (2012). Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*. *BMC Genomics*, 13, 531.
- Gazzinelli, R., Ropert, C., & Campos, M. A. (2004). Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunological Reviews*, 201 , 9–25.

- Hamilton, P. B., Lewis, M. D., Cruickshank, C., Gaunt, M. W., Yeo, M., Llewellyn, M. S., . . . Teixeira, M. M. (2011). Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. *Infect Genet Evol.*, *11*(1), 44-51.
- Henriques, C., Henriques-Pons, A., Meuser-Batista, M., Ribeiro, A. S., & de Souza, W. (2014). In vivo imaging of mice infected with bioluminescent *Trypanosoma cruzi* unveils novel sites of infection. *Parasit Vectors.*, *7*(89).
- Hoft, D., Schnapp, A., Eickhoff, C., & Roodman, S. (2000). Involvement of CD41 Th1 Cells in Systemic Immunity Protective against Primary and Secondary Challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 197–204.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, *35*, W585–W587.
- Hunter, C. A., Ellis-Neyes, L., Slifer, T., Kanaly, S., Grünig, G., Fort, M., . . . Araujo, F. G. (1997). IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, *158*(7), 3311-3316.
- Ito, I., Fukazawa, J., & Yoshida, M. (2007). Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem*, *282*, 16336–16344.
- Jiménez, P., Jaimes, J., Poveda, C., & Ramírez, J. (2019). A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*, *146*(3), 269-283.
- Jumper, J., Evans, R., & Pritzel, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*, 583–589.
- Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D. C., Melo, M. B., Ropert, C., Rodrigues, M. M., & Gazzinelli, R. T. (2010). The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.*, *12*, e29.

- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acid Res*, *30*(14), 3059-3066.
- Kawase, T., Sato, K., Ueda, T., & Yoshida, M. (2008). Distinct domains in HMGB1 are involved in specific intramolecular and nucleosomal interactions. *Biochemistry*, *47*(52), 13991-13996.
- Kazama, H., Ricci, J. E., Herndon, J. M., Hoppe, G., Green, D. R., & Ferguson, T. A. (2008). Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity*, *29*, 21-32.
- Kierszenbaum, F. (2007). Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitologica*, *52*(1), 1–12.
- Klune, J. R., Dhupar, R., & Cardinal, J. (2008). HMGB1: Endogenous Danger Signaling. *Mol Med*, *14*, 476–484.
- Krautz, G. M., Kissinger, J. C., & Krettli, A. (2000). The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*, *16*(1), 31-24.
- Kumar, S., & Tarleton, R. (1998). The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*, *20*(5), 207-216.
- Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., & Gaunt, M. W. (2009). Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Int. J. Parasitol.*, *39*, 1305-1317.
- Li, A., Xue, Y., Jin, C., Wang, M., & Yao, X. (2006). Prediction of Nepsilon-acetylation on internal lysines implemented in Bayesian Discriminant Method. *Biochemical and biophysical research communications*, *350*(4), 818–824.
- Li, Y., Shah-Simpson, S., Okrah, K., Belew, A. T., Choi, J., Caradonna, K. L., . . . Burleigh, B. A. (2016). Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. *PLoS Pathog*, *12*, 4.

- Lu, B., Antoine, D. J., Kwan, K., Lundbäck, P., Wähämaa, H., & Schierbeck, H. (2014). JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, *111*, 3068–3073.
- Marchini, F. K., de Godoy, L. M., Rampazzo, R. C., Pavoni, D. P., Probst, C. M., Gnad, F., . . . Krieger, M. A. (2011). Profiling the *Trypanosoma cruzi* Phosphoproteome. *PLoS ONE*, *6*, 9.
- Martin, D. (2004). Generation, specificity, and function of CD8 + T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological Reviews*, *201*, 304–317.
- Martin, D., & Tarleton, R. (2004). Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev.*, *201*, 304-317.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.*, *12*, 991-1045.
- Ministerio de la Nación. (2012). *Guías para la atención al paciente infectado con Trypanosoma cruzi (Enfermedad de Chagas)*. Buenos Aires. Obtenido de Ministerio de Salud de la Nación.
- Minning, T. A. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, *10*, 370.
- Minning, T. A., Weatherly, D. B., Atwood 3rd, J., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, *10*, 370.
- Morrot, A., de Meis, J., Farias-de-Oliveira, D. A., Serra Villa-Verde, D. M., & Savino, W. (2009). Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.*, *3*(7), 417.
- Morrot, A., Villar, S. R., González, F. B., & Pérez, A. R. (2016). Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: Two Sides of the Same Coin in Chagas Disease? *Front Microbiol.*, *7*, 704. doi:doi: 10.3389/fmicb.2016.00704.

- Oh, Y. J., Youn, J. H., Ji, Y., Lee, S. E., Lim, K. J., & Choi, J. E. (2009). HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *J Immunol*, *182*, 5800–5809.
- Oliveira, A. C., Peixoto, J. R., de Arruda, L. B., Campos, M. A., Gazzinelli, R. T., Golenbock, D. T., . . . Bellio, M. (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol*, *173*(9), 5688-5696.
- OMS. (1 de Abril de 2021). *Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- OPS. (2021). *Enfermedad de Chagas*. Obtenido de Organización Panamericana de la Salud: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- OrthoMCL. (2021). Obtenido de <https://orthomcl.org/orthomcl/>
- Pasheva, I., & Ugrinova, E. (2016). HMGB1 Protein: A Therapeutic Target Inside and Outside the Cell. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, ISSN 1876-1623.
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.*, *1*(2), 92-100.
- Punukollu, G., Gowda, R., Khan, I. A., Navarro, V. S., & Vasavada, B. C. (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, *115*, 279–283.
- Qiu, W. R., Xiao, X., Lin, W. Z., & Chou, K. C. (2014). iMethyl-PseAAC: identification of protein methylation sites via a pseudo amino acid composition approach. *Biomed Res Int.*, *2014*, 947416.
- Rassi Jr, A., Rassi, A., & Little, W. C. (2000). Chagas' Heart Disease. *Clin. Cardiol.*, *23*, 883-889.
- Rassi Jr, A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin N Am*, *26*, 275–291.

- Reis-Cunha, J. L., Baptista, R. P., Rodrigues-Luiz, G. F., Coqueiro-Dos-Santos, A., Valdivia, H. O., de Almeida, L. V., . . . Bartholomeu, D. C. (2018). Whole genome sequencing of *Trypanosoma cruzi* field isolates reveals extensive genomic variability and complex aneuploidy patterns within TcII DTU. *BMC Genomics*, *19*(1), 816.
- Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, *42*(W1), W320–W324.
- Roggero, E., Perez, A. R., Tamae-Kakazu, M., Piazzon, I., Nepomnaschy, I., Wietzerbin, J., . . . Bottasso, O. (2002). Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol*, *128*, 421-428.
- Sanmartino, M. (2009). 100 años de Chagas (1909-2009): revisión, balance y perspectiva. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, *68*(3-4), 243-252.
- Santi-Rocca, J., Fernandez-Cortes, F., & Chillón-Marinas, C. (2017). A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. *Sci Rep*, *7*, 8893.
- Savino, W., Villa-Verde, D., Mendes-da-Cruz, D., Silva-Monteiro, E., Perez, A., Aoki Mdel, P., . . . Gea, S. (2007). Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev*, *18*, 107–124.
- Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, *418*, 191–195.
- Schenkman, S., Moretti, N. S., Cestari, I., Anupama, A., & Stuart, K. (2018). Comparative Proteomic Analysis of Lysine Acetylation in Trypanosomes. *J. Proteome Res.*, *17*, 374–385.
- Sessa, L., & Bianchi, M. E. (2007). The evolution of High Mobility Group Box (HMGB) chromatin proteins in multicellular animals. *Gene*, *387*, 133–140.
- Shikanai-Yasuda, M. A., & Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.*, *54*(6), 845-852.

- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 27(1), 135–145.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., . . . Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.*, 7, 539.
- Silva, J. S., Twardzik, D. R., & Reed, S. G. (1991). Regulation of Trypanosoma cruzi Infections In Vitro and In Vivo by Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). *J. Exp. Med*, 174, 539-545.
- Smircich, P., Eastman, G., Bispo, S., Duhagon, M. A., Guerra-Slompo, E. P., Garat, B., . . . Sotelo-Silveira, R. (2015). Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in Trypanosoma cruzi. *BMC Genomics*, 16, 443.
- Štros, M. (2010). HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1799, 101–113.
- Stros, M., Launholt, D., & Grasser, K. D. (2007). The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.*, 64(19-20), 2590-2606.
- Sturm, N. R., Vargas, N. S., Westenberger, S. J., Zingales, B., & Campbell, D. A. (2003). Evidence for multiple hybrid groups in Trypanosoma cruzi. *Int J Parasitol.*, 33(3), 269–279.
- Tang, D., Kang, R., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2011). High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxid Redox Signal*, 14, 1315–1335.
- Tarleton, R. L. (2007). Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. *Current Opinion in Immunology* , 19, 430–434.
- Tavernelli, L. E., Motta, M. C., Silva Gonçalves, C., Santos da Silva, M., Elias, M. C., Alonso, V. L., . . . Cribb, P. (2019). Overexpression of Trypanosoma cruzi High Mobility

- Group B protein (TcHMGB) alters the nuclear (TcHMGB) alters the nuclear reduces the parasite infectivity. *Nature. Scientific Reports*, 9, 192.
- Teixeira, A. R., Nitz, N., Guimaro, M. C., Gomes, C., & Santos-Buch, C. A. (2006). Chagas disease. *Postgrad Med J*, 82(974), 788–798.
- Toso, A. M., Vial, F. U., & Galanti, N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile*, 139(2), 258-266.
- Trischmann, T. M., & Bloom, B. R. (1982). Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.*, 35(2), 546-551.
- TritypDB*. (2021). Obtenido de <https://tritypdb.org/tritypdb/app>
- Wang, D., Liu, D., Yuchi, J., He, F., Jiang, Y., Cai, S., . . . Xu, D. (2020). MusiteDeep: a deep-learning based webserver for protein post-translational modification site prediction and visualization. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W140–W146.
- Wang, W., Peng, D., Baptista, R. P., Li, Y., Kissinger, J. C., & Tarleton, R. L. (2021). Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *PLoS Pathog.*, 17(1), e1009254.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189-1191.
- Yang, H. L.-H. (2012). Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol Med*, 18, 250–259.
- Yang, H., & Tracey, K. J. (2012). Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(1-2), 149-156.
- Yang, H., Lundbäck, P., Ottosson, L., Erlandsson-Harris, H., Vénéreau, E., & Bianchi, M. E. (2012). Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol Med*, 18, 250–259.
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., . . . Ren, J. (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W325–W330.

Zingales, B. (2018). Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.*, 184, 38-52.