

LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES TOR DE MAMÍFEROS ESTÁ PRESENTE EN *TRYPANOSOMA CRUZI*. RECONSTRUCCIÓN *IN SILICO* Y POSIBLES FUNCIONES

FABIO A. DIGIROLAMO, MARIANA R. MIRANDA, LEÓN A. BOUVIER, MARÍA M. CÁMARA,
GASPAR E. CÁNEPA, CLAUDIO A. PEREIRA

Laboratorio de Biología Molecular de Trypanosoma cruzi, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, (UBA-CONICET), Buenos Aires

Resumen La vía TOR ("Target Of Rapamycin") de mamíferos es una red proteica de regulación para una amplia gama de procesos involucrados en el crecimiento y la diferenciación celular, constituyendo un interruptor funcional entre el metabolismo anabólico y catabólico de la célula. El *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, tiene un ciclo de vida muy complejo con diferentes estadios morfológicos en varios hospedadores. Este ciclo de vida implica que los parásitos enfrentan grandes fluctuaciones en el medio extracelular que deben ser detectadas y a las cuales deben responder adaptando su metabolismo. Un candidato a ser el mediador entre los receptores/sensores del medio y la respuesta adaptativa celular es la vía TOR. En este trabajo integramos los datos bibliográficos de la vía TOR de organismos tripanosomátidos con un análisis *in silico* (simulación computacional de procesos o estructuras biológicas) del genoma del parásito. Se proponen además posibles efectores y procesos regulados por esta ruta metabólica. Teniendo en cuenta que existe muy poca información sobre los mecanismos de transducción de señales en tripanosomátidos, consideramos que el mapa presentado en este trabajo puede ser una referencia para futuros trabajos experimentales.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, mTOR, transducción de señales

Abstract *The mammalian TOR pathway is present in Trypanosoma cruzi. In silico reconstruction and possible functions.* The mammalian TOR pathway ("Target Of Rapamycin") is a regulatory protein network involved in a wide range of processes including cell growth and differentiation, providing a functional switch between anabolic and catabolic cell metabolism. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, has a complex life cycle with different morphological stages in various hosts. This life cycle implies that parasites have to deal with fluctuations in the extracellular medium that should be detected and counteracted adapting their metabolism. A candidate to be the mediator between the receptors / sensors of the environment and cellular adaptive response is the TOR pathway. In this paper we integrate the bibliographic data of the TOR pathway in trypanosomatids by *in silico* analysis (computer simulation of biological structures and processes) of the parasite's genome. Possible effectors and processes regulated by this metabolic pathway are also proposed. Given that the information on the mechanisms of signal transduction in trypanosomatids is scarce, we consider the model presented in this work may be a reference for future experimental work.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, mTOR, signal transduction

En 1974 se descubría el sirolimus, un fungicida producido por una bacteria aislada de una muestra de suelo de la Isla de Pascua¹. El sirolimus, también conocido como rapamicina, fue utilizado posteriormente en el tratamiento de diferentes enfermedades por su acción antimitótica. Luego de 20 años se descubre una proteína que se asociaba al complejo rapamicina-receptor y este mecanismo regula diferentes vías de señalización intracelular². A esta

proteína se la denominó mTOR por "Mammalian Target Of Rapamycin" y hoy es uno de los principales protagonistas de mecanismos de transducción de señales que ocupan la atención de los científicos. En este trabajo se realiza una revisión resumida de la ruta TOR de mamíferos y en la segunda parte se integra la información disponible en la bibliografía con los resultados obtenidos del análisis bioinformático del genoma de *Trypanosoma cruzi*, proponiéndose un modelo de la estructura y dinámica de esta compleja red proteica en el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Para facilitar su comprensión, la Tabla 1 resume las funciones y nombres de cada uno de los componentes que se mencionan, y las Figs. 1 y 2 esquematizan las interacciones entre los diferentes actores de la vía TOR en mamíferos y tripanosomátidos, respectivamente.

Recibido: 16-XII-2011

Aceptado: 28-III-2012

Dirección postal: Dr. Claudio A. Pereira, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de Malvinas 3150, 1427, Buenos Aires, Argentina

Fax: (54-11) 4523-8701

e-mail: cpereira@retina.ar

TABLA 1.— Resumen de los componentes de la vía TOR

Proteína	Nombre	Función	Kinetoplastidos
GFR	<i>Grow Factor Receptor</i>	Superfamilia de receptores localizados en la membrana plasmática que presentan actividad tirosina quinasa intrínseca	Ausente
PI3k	<i>Phosphoinositol 3-kinase</i>	Son una familia de enzimas capaces de fosforilar el grupo hidroxilo de la posición 3' del anillo inositol de las moléculas llamadas en conjunto fosfatidilinositol	Presente
Akt	<i>Protein kinase B</i> (la sigla no se refiere a su función)	Juegan un importante rol en la señalización celular. Estas enzimas pertenecen a la superfamilia de las serina/treonina proteína kinasas no específicas	Presente
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>	Específicamente cataliza la desfosforilación del fosfoinositol 3 fosfato (PIP 3) a fosfo-inositol2 fosfato (PIP2). Esta desfosforilación es importante porque da lugar a la inhibición de la AKT	Presente
TSC1/TSC2	<i>Tuberous Sclerosis Protein 1 y 2</i>	En caso de estrés (daño en el ADN, hipoxia) o baja disponibilidad de energía, se activa y regula la síntesis de proteínas hacia la baja	Ausente
RHEB	<i>Ras homolog enriched in brain</i>	Miembro de la superfamilia de GTPasas (RAS relacionadas con la unión a GTP). Esta proteína es vital en la regulación del crecimiento y la progresión del ciclo celular	Presente
MTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>	Es una proteína quinasa que regula el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular	Presente
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of TOR</i>	Proteína reguladora que se asocia junto con otras proteínas y mTOR para formar el complejo mTOR1	Presente
Rictor	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>	Proteína que forma un complejo de proteínas múltiples llamado mTORC2 que activa AKT y la síntesis de actina	Presente
4-EBP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>	La interacción de esta proteína con eIF4E (el cual recluta la subunidad S40 al extremo 5' del ARNm) inhibe el montaje del complejo y reprime la traducción	Presente
S6K1	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>	Esta quinasa contiene 2 dominios catalíticos y fosforila varios residuos de la proteína ribosomal S6. Su actividad conduce a un aumento en la síntesis de proteínas y la proliferación celular	Presente

La vía TOR en mamíferos (mTOR)

La proteína mTOR es una serina/treonina quinasa y un componente esencial de complejos muy conservados evolutivamente en células eucariotas, que regulan una gran variedad de procesos como el crecimiento, la proliferación, la motilidad, la transcripción y la traducción, entre otros³. De este modo mTOR tiene funciones pleiotrópicas participando en la transducción de señales en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, la concentración de aminoácidos, los niveles de energía y la concentración

de factores extracelulares, modulando diferentes mecanismos efectores como la fagocitosis, la biogénesis ribosomal, la reorganización del citoesqueleto, el tráfico de membrana y la activación de la cascada mediada por la proteína quinasa C (PKC)⁴. La desregulación de la ruta mTOR es un elemento clave en el desarrollo de diferentes tipos de tumores y otras enfermedades humanas.

En los eucariotas superiores la proteína mTOR forma parte de al menos dos complejos moleculares con funciones diferentes: mTORC1, el cual es sensible a la rapamicina y que se caracteriza por la asociación con la proteína

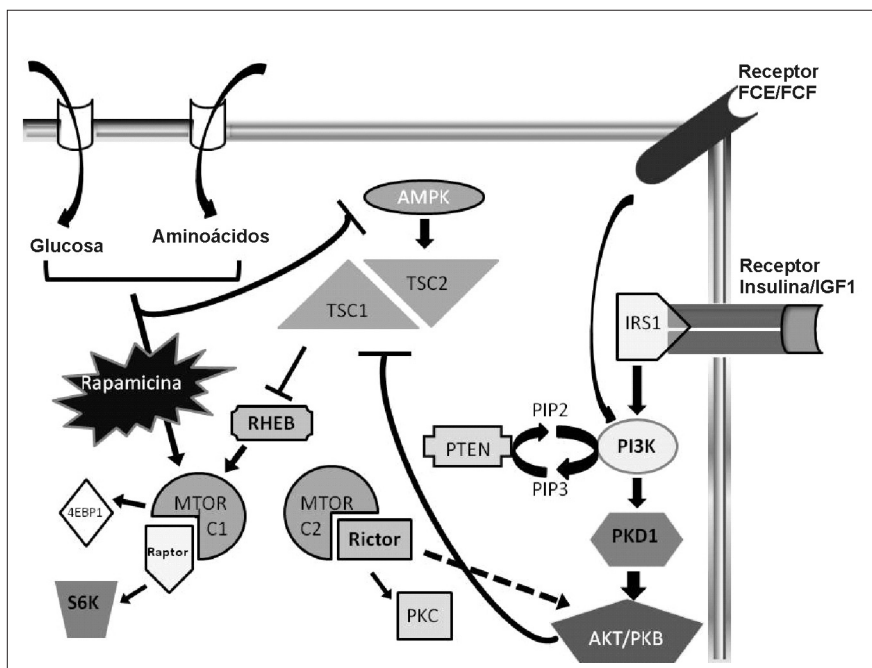


Fig. 1.– Esquema de la ruta TOR de mamíferos indicando sus componentes principales e interacciones. Las líneas continuas representan las interacciones cuya existencia fue demostrada y las líneas punteadas las hipotéticas. Las flechas indican activación y los extremos romos inhibición.

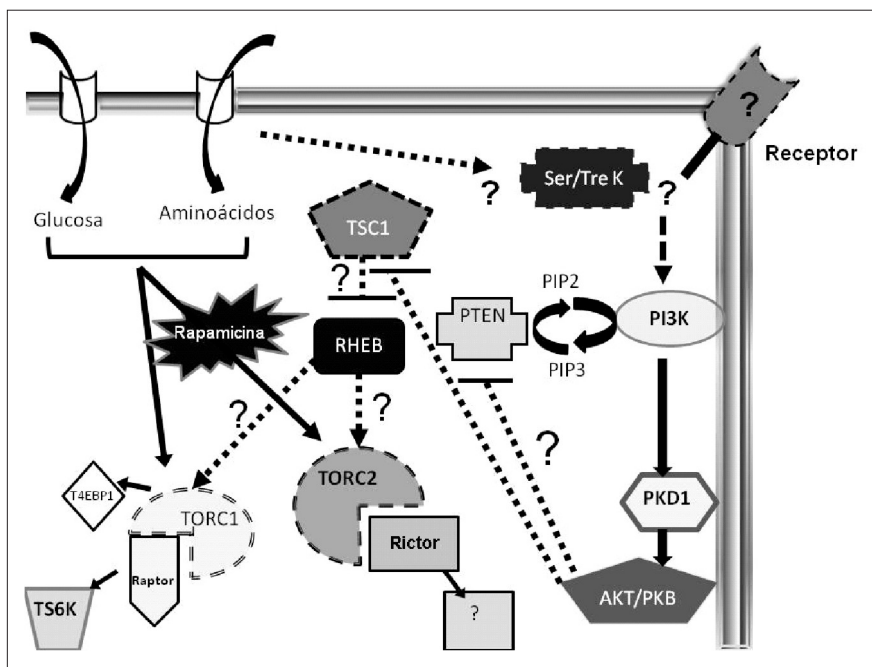


Fig. 2.– Esquema de la ruta TOR de tripanosomátidos indicando sus componentes principales e interacciones. Las líneas continuas representan las interacciones, complejos o proteínas cuya existencia fue demostrada y las líneas punteadas las hipotéticas. Las flechas indican activación y los extremos romos inhibición.

Raptor que regula de forma positiva el crecimiento celular y la síntesis proteica. El segundo complejo, mTORC2, es insensible a la rapamicina, y mediante la interacción con la proteína Rictor regula y modula el desarrollo del citoesqueleto y la supervivencia celular.

En mamíferos, la activación de algunos componentes involucrados en la transducción de señales como las fosfatidilinositol-3 quinasas (PI3K) y mTOR puede ocurrir a través de proteínas Ras activadas ("rats sarcoma", primer oncogén aislado a partir de ratas que padecían sarcoma; son pequeñas GTPasas) o directamente por algunos receptores tirosina quinasa, que responden a factores de crecimiento y citoquinas como las interleucinas, el factor de crecimiento tipo insulina (IGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor estimulador de colonias (CSF). Una vez fosforilada la PI3K cataliza la conversión de un fosfolípido denominado PIP2 (fosfoinositol 4, 5 bifosfato) en PIP3 (fosfoinositol 3, 4, 5 trifosfato). El PIP3 recluta a otra proteína quinasa, Akt (también llamada proteína quinasa B o PKB) al lado citosólico de la membrana plasmática provocando la activación de esta última por su fosforilación a través de PKD1, una quinasa dependiente de PIP3. Akt activada regula el crecimiento y la supervivencia celular a través de la fosforilación de varias proteínas apoptóticas y de factores de transcripción que regulan genes anti-apoptóticos inhibiendo la muerte celular. Otro sustrato importante de Akt para la activación de la ruta mTOR es la inactivación del complejo de la esclerosis tuberosa (TSC1/TSC2) que actúa como una proteína GAP (proteína activadora de GTPasas) inhibiendo la proteína G-Rheb (Ras). Una vez que Rheb se disocia del complejo TSC1/TSC2 activa a mTOR.

En una ruta paralela, un sensor del estado energético celular, la AMPK (proteína quinasa activada por AMP), activada por un aumento de la relación AMP/ATP puede fosforilar a TSC2 en otro sitio, en respuesta a la caída en el balance de energía celular, lo que provoca un aumento en la afinidad por Rheb inactivándola junto a mTOR. Otra fosfatasa importante en la regulación de la ruta en mamíferos es PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), la cual promueve la reconversión de PIP3 en PIP2, lo que provoca una inactivación de Akt.

Una vez activada mTOR tiene dos caminos, uno que modula el crecimiento celular a través de la regulación de la traducción de proteínas, y el segundo que interviene en la remodelación del citoesqueleto mediante la regulación de sus componentes. En el primer camino participan las proteínas Raptor, mLST8/GüL y las recientemente identificadas Prs40 y Deptor con las cuales regula el crecimiento celular a través de la activación por fosforilación de pS6K1 y 4E-BP1. La activación de la pS6K provoca la fosforilación de la proteína ribosomal S6 facilitando la traducción de un subconjunto de ARNm que contiene un 5' polipirimidinico (5' TOP) favoreciendo

la biogénesis ribosomal y la elongación de la traducción. La fosforilación de 4E-BP1 (factor de unión al iniciador de traducción eucariótico) permite el desacople de ésta con el factor de elongación eIF4E permitiendo su unión al eIF4G, a su vez Ras activada a través de las MAPKs activadas (*Mitogen activated protein kinases*, o *proteín kinasas activadas por mitógenos*) inducen la fosforilación de eIF4E aumentando su afinidad por eIF4G formándose el complejo eIF4F, lo que permite el inicio de la mayor parte de la traducción celular. El otro camino en la activación de Akt es mediante mTOR asociado a Rictor, GüL y mSIN1 formando el complejo mTORC2, el cual puede fosforilar Akt lo que induce una segunda fosforilación por PKD1 provocando una activación plena de Akt. El complejo mTORC2 a su vez constituye un regulador importante del citoesqueleto a través de la activación de F-actina, RhoA, Rac1, Rac2, Cdc42 y PKC⁵.

La vía TOR en tripanosomátidos (tTOR)

Los parásitos protozoarios infectan millones de personas cada año y representan un gran problema de salud en zonas de pobreza. El orden Kinetoplastida incluye los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, los cuales son responsables de muchas de las enfermedades desatendidas en humanos. Una vez completado el proyecto genoma de los tripanosomátidos *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* (Trityps) en el año 2005⁶, el análisis posterior de los datos está permitiendo un avance significativo en la comprensión y reconstrucción de muchos procesos metabólicos y de transducción de señales en protozoos, incluyendo algunos mediados por PI3Ks⁷. Un aspecto interesante de la vía TOR es su conservación en la mayoría de los eucariotas analizados, incluyendo a organismos muy primitivos como el protozoo amitochondriado *Giardia lamblia*⁸ además de los tripanosomátidos mencionados⁹⁻¹¹; de esta manera la vía mTOR es un atractivo blanco para el desarrollo de nuevas drogas. Sin embargo, nuestro conocimiento es escaso tanto en lo que respecta a los componentes de la vía río arriba, es decir, los estímulos extracelulares que activan las señales en esta ruta, como así también los efectos río abajo, el crecimiento y la diferenciación celular.

Predicción de la vía TOR en tripanosomátidos

A continuación incluimos una reconstrucción *in silico* de la ruta mTOR en *T. cruzi*, incluyendo sus principales componentes previamente reportados en la bibliografía, como así también aquellos que surgieron del procesamiento de los datos del genoma. El procesamiento *in silico* incluye la búsqueda por similitud de secuencia en los genomas de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major* de cada una de las proteínas de esta vía, utilizando como

referencias aquellas previamente reportadas en otros organismos y diferentes herramientas bioinformáticas.

Recientemente se ha comprobado que la rapamicina actúa en el parásito que provoca la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana, el *T. brucei*, de manera diferente que en mamíferos y otros eucariotas inhibiendo de forma exclusiva la señal TORC2, donde TORC1 es completamente insensible al fármaco¹². Posteriormente fueron identificados en *T. brucei* dos ortólogos de mTOR, denominados TbTOR1 y TbTOR2, además de otros dos genes más divergentes denominados TbTOR-like 1 y TbTOR-like 2, junto a dos tipos diferentes de TOR-like quinasa, las cuales no fueron descritas a la fecha en otros organismos¹². La quinasa TOR-like 1 parecería estar implicada en el control de los niveles de polifosfatos y calcio, sugiriendo un vínculo entre la señalización de la ruta TOR y la respuesta osmótica, la cual es muy relevante considerando la variedad de ambientes que atraviesa el parásito en su ciclo de vida¹³. Las proteínas Raptor y Rictor, como se mencionó anteriormente, definen dos complejos conteniendo a TOR, TORC1 y TORC2, que están involucrados en las diferentes cascadas de señales. En *T. brucei* las proteínas TbTOR no interactúan de igual modo con cualquier componente del complejo. TbTOR1 interactúa principalmente con TbRaptor, aunque también se ha detectado una interacción débil con TbRictor. Por el contrario, se ha demostrado que TbRictor, y nunca TbRaptor, interactúa con TbTOR2, indicando que TbTOR2 es una proteína TORC2 específica. No fue detectada ninguna interacción entre TbTOR-like 1/2 con TbRaptor o TbRictor, sugiriendo que TbTOR-like 1/2 no están involucradas en ninguna de las cascadas de señales previamente descritas en mamíferos¹³. Parecería ser que en organismos tripanosomátidos la localización de las moléculas juega un papel crítico en la regulación de su función y en la especificidad. En eucariotas superiores, las quinasas TOR regulan el crecimiento celular según su asociación con distintos componentes de los complejos de proteínas. Todo indicaría que en el caso de los tripanosomátidos, y específicamente en *T. brucei*, el papel de TbTOR1 y TbTOR2 en la regulación del crecimiento celular no puede ser complementada; la supresión individual de TbTOR1 y TbTOR2 inhibe la proliferación celular por sí sola, sugiriendo que únicamente TbTOR1 puede formar el complejo equivalente a mTORC1 y TbTOR2 forma el complejo mTORC2. Se ha demostrado que TbTOR1 se localiza en el núcleo regulando los aspectos temporales del crecimiento celular mientras que TbTOR2 se localiza en el citoplasma regulando la polarización celular y la citocinesis.

En lo que respecta a *T. cruzi*, se han detectado secuencias que comparten una alta identidad con su ortólogo TbTOR; sin embargo, este gen no posee ninguno de los dominios esperados en una quinasa del tipo TOR y por lo tanto requiere de una validación experimental. Todos los otros genes codificantes para putativas quinasas TOR,

muestran dominios que se corresponden con quinasas del tipo de TOR. Por último, tres de los genes mencionados de quinasas TOR también tienen el dominio de reconocimiento para rapamicina.

Con respecto a las fosfatasa regulatorias, se han hallado secuencias homólogas con PTEN. El rol de PTEN en la desfosforilación del PIP3 en mamíferos puede ser similar en el metabolismo de los kinetoplastidos y de esa manera ser una diana específica de utilidad terapéutica. Secuencias PTEN con dos diferentes arquitecturas de dominios funcionales fueron identificadas en tres kinetoplastidos de las cuales sólo una es similar a mamíferos¹⁴. Esta divergencia también es observada en la filogenia de los kinetoplastidos, *T. brucei* no presenta secuencias homólogas con la PTEN de mamíferos mientras que *T. cruzi* tiene cuatro y *Leishmania major* uno.

En el genoma de *T. cruzi* hay una gran cantidad de quinasas, algunas de ellas con una moderada similitud de secuencia con la proteína quinasa B (Akt), pero su identificación requiere una confirmación experimental. Los complejos mTOR de tripanosomátidos parecen estar desprovistos de componentes reportados en otros organismos como Pras40, Sin1, Proctor y Deptor. Otras proteínas que tampoco han podido ser identificadas hasta la fecha son las TSC1 y TSC2, aunque su presencia en el genoma no puede ser descartada. En lo que respecta a otras quinasas de la vía, se han encontrado secuencia homólogas a Akt, LKB1 y PDK1, otras GTPasas, AMPK y RAG^{15, 16}. Sorprendentemente, los receptores tirosina quinasa asociados no estarían presentes y su función podría estar reemplazada en tripanosomátidos por moléculas aun no identificadas. Existen numerosas serina/ treonina quinasas de membrana plasmática que serían los candidatos de sensar el medio ambiente y de estar asociados al complejo TORC2¹². De los componentes río abajo o efectores de la ruta mTOR se han descrito cuatro homólogos a eIF4E; Tbel4E1/2, similar en a los metazoos y los TbEIF4E3/4. TbEIF4E1/2 se localizan tanto en el núcleo como en el citoplasma, mientras que TbEIF4E3/4 son más abundantes y estrictamente nucleares. Mediante ensayos de interferencia por ARN (RNAi) se demostró que TbEIF4E3 es esencial para la viabilidad de la forma procíclica (etapa del parásito en el insecto vector), mientras que TbEIF4E1/3/4 lo son para la forma sanguínea presente en el mamífero. También se descubrió que la pérdida en la función TbelF4E1/2 causa el cese del crecimiento y la muerte en procíclicos, con un efecto retardado en la traducción, mientras que TbelF4E3 llevó primero a la inhibición de la traducción y posteriormente a la muerte del parásito¹⁷. Sólo se encontraron en *T. brucei* homólogos de algunos de los factores de elongación presentes en otros organismos, indispensables para la traducción. En mamíferos TORC1 también es activado por un aumento en la concentración de aminoácidos¹⁸ vía Rag y pequeñas proteínas G. Es interesante que una parte de esta vía de

activación de mTOR pudiese estar conservada en *T. cruzi* ya que posee en su genoma una gran familia de transportadores de aminoácidos que podrían estar actuando como sensores ambientales¹⁹⁻²¹.

En la actualidad es poco lo que se conoce de esta vía de transducción de señales y segundos mensajeros en tripanosomátidos y, aunque es un tema muy activo, todavía no se han identificado las moléculas responsables de sensar las múltiples y variables condiciones extracelulares que atraviesa el parásito durante su ciclo de vida. La utilización de inhibidores de la ruta mTOR como la rapamicina en mamíferos (a concentraciones elevadas) interrumpe numerosos procesos fisiológicos en los tripanosomátidos, y la presencia de muchos componentes de esta ruta con arquitecturas muy singulares, nos permite especular que del estudio de la vía mTOR en *T. cruzi*, pueden surgir varias dianas terapéuticas específicas e inhibidores que solo actúen en el parásito y en baja o nula medida en su hospedador, para su aplicación terapéutica en el mal de Chagas.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 2010-0685) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT PICT 2008-1209 y PICT 2010-0289). C.A.P. y M.R.M. son miembros de la carrera de investigador científico del CONICET, G.E.C., M.M.C. y L.A.B. son becarios del CONICET. Finalmente, un agradecimiento especial al Dr. Juan Antonio Barcat por su paciencia con las correcciones del manuscrito.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

- Vézina C, Kudelski A, Sehgal S. Rapamycin, a new anti-fungal antibiotic. *J. Antibiot* 1975; 28: 721-26.
- Beevers C, Li F, Liu L, Huang S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *Int J Cancer* 2006; 119: 757-64.
- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926-45.
- Cybulski N, Hall M. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci* 2009; 34: 620-27.
- El-Sayed N, Myler P, Bartholomeu D, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005; 309: 409-15.
- Bahia D, Oliveira L, Mitsuo Lima F, et al. The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* – New tools for designing specific inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 963-70.
- Conceição J, Ruiz Morrison HG, Zamora G, Campbell RK, Sogin ML. Inferring protein function from genomic sequence: *Giardia lamblia* expresses a phosphatidylinositol kinase-related kinase similar to yeast and mammalian TOR. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2002; 133: 477-91.
- Madeira da Silva L, Beverley SM. Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in *Leishmania* shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 11965-70.
- Diaz-Gonzalez R, Matthew Kuhlmann F, Galan-Rodriguez C, et al. The susceptibility of trypanosomatid pathogens to PI3/mTOR kinase inhibitors affords a new opportunity for drug repurposing. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: 1297.
- Barquilla A, Crespo JL, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 14579-84.
- Parsons M, Worthey EA, Ward PN, Mottram JC. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 2005; 6: 127.
- de Jesus TC, Tonelli RR, Nardelli SC, da Silva A L, et al. Target of rapamycin (TOR)-like 1 kinase is involved in the control of polyphosphate levels and acidocalcisome maintenance in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 2010; 285: 24131-40.
- Rachel B, Humera T, Helen M, et al. The TriTryp Phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics* 2007; 8: 434.
- Fiel M, O'Reilly A. How complex is GTPase signaling in trypanosomes? *Trends Parasitol* 2008; 24: 253-7.
- Freire ER, Dhalia R, Moura DM, da Costa Lima TD. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 176: 25-36.
- Shaw RJ. mTOR signaling: RAG GTPases transmit the amino acid signal. *Trends Biochem Sci* 2008; 33: 565-8.
- Taylor PM. Amino acid transporters: éminences grises of nutrient signalling mechanisms? *Biochem Soc Tran* 2009; 37: 237-41.
- Goberdhan DC, Ogmundsdóttir MH, Kazi S, et al. Amino acid sensing and mTOR regulation: inside or out? *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 248-52.
- Inbar E, Canepa GE, Carrillo C, et al. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. *Amino Acids* 2012; 42: 347-60.
- Miranda MR, Sayé M, Bouvier LA, Cámara M de L, Montserrat J, Pereira CA. Cationic amino acid uptake constitutes a metabolic regulation mechanism and occurs in the flagellar pocket of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 2012; 7:e32760.
- Pereira CA, Carrillo C, Miranda MR, Bouvier LA, Cánepa GE. *Trypanosoma cruzi*: transport of essential metabolites acquired from the host. *Medicina (B Aires)* 2008; 68:398-404.