



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM

"Biología de Profilina en *Trypanosoma Cruzi*"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

JULIANA HERRERA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS

MEXICO, D.F.

DICIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México la enorme oportunidad de formar parte de ella y generosamente formarme académicamente como Química y ahora como Maestra en Ciencias Biológicas.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de México, por permitirme ser parte de su programa y darme la oportunidad de superarme profesionalmente.

A los miembros de mi Comité Tutorial:

A mí asesora, la Dra. Ana María Cevallos Gaos.

Al Dr. Roberto Jose Rafael Hernández Fernández.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Gracias por su paciencia, apoyo y compartir sus conocimientos durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado examinador que amablemente revisaron mi tesis y contribuyeron con sus correcciones para mejorarla: Dra Rosaura Hernández Rivas, Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández, Dra. Ana María Cevallos Gaos, Dr. Roberto Jose Rafael Hernández Fernández y Dr. Santiago Martínez Calvillo.

A la Dra. Imelda López por su gentil ayuda en la elaboración de la Biblioteca Genómica de *T.cruzi* con la que inicie el presente trabajo y por sus comentarios enriquecedores durante los seminarios de grupo.

Agradezco al Biol. Jesus Alejandro Aguilar por el gran apoyo y asesoría brindados en la parte de Bioinformática realizados en la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS.

De forma muy especial agradezco al Dr. Roberto Hernández por el apoyo brindado como jefe, guía y amigo; enfocado siempre al profesionalismo académico de los que somos y fueron parte de su grupo de trabajo.

De igual forma agradezco a la Dra Ana Ma. Cevallos Gaos por su dedicación y ser proveedora del conocimiento que comparte en todo momento.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios de la nueva sede del Inst. Inv. Biomédicas B142, B143, Sra Tere y de etapas pasadas que siguen estando presentes y cuya amistad agradezco.

DEDICATORIAS

Al perfecto trío matriarcal que han brindado apoyo, sentido y dirección en mi vida:
Juliana Rodríguez, Carolina López y Ofelia López.

A mis hermanas: Adris, Carolina y Diana; las mejores confidentes y ante todo amigas.

A mis primas y especialmente al primo Jorge quién seguramente logrará sus metas propuestas.

A mis sobrinas: Hania, Giovana, Dianelly, Daniela; y sobrinos Dilan, Federico y Cristian.

A mis amigas y amigos: Mari Carmen, Mari Paz, Yayoi, Lulú Arevalo, Rocío, Paty, Arturo, Temo, Jesus y compañeros del grupo de acondicionamiento físico del profesor Lorenzo.

A todos aquellos que seguramente olvidé mencionar, y que contribuyeron directa o indirectamente al logro de esta meta. Les pido disculpas.

Contenido

ABREVIATURAS USADAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS	9
RESÚMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Generalidades de cinetopláستidos.	12
1.2. Familia Trypanosomatidae.	12
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> .	15
1.3.1. Ciclo de vida.	15
1.3.2. Enfermedad de Chagas.	17
1.3.3. El proyecto de genoma de <i>T. cruzi</i> .	19
1.3.4. Organización genómica.	20
1.3.5. Transcripción.	20
1.3.6. Procesamiento de los RNAm.	21
1.4. Citoesqueleto en eucariontes	23
1.4.1. Citoesqueleto de actina.	23
1.4.1.1. Actina.	23
1.4.1.2. Proteínas de unión a actina	25
1.4.1.3. Vías de señalización	26
1.5. Profilina	27
1.5.1. Generalidades	27
1.5.2. Isoformas de profilina.	28
1.5.3. Estructura de profilina	29
1.5.4. Ligandos de unión a profilina.	30
1.6. Sobre el citoesqueleto de tripanosomátidos.	34
1.6.1. Profilina en tripanosomátidos	38
2. OBJETIVO.	39
2.1. Objetivos particulares	39

3.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1.	Cultivo y extracción de ácidos nucleicos	40
3.1.1.	Cultivos celulares.	40
3.1.2.	Extracción de DNA genómico.	40
3.1.3.	Extracción de RNA con Trizol.	41
3.2.	Obtención de una sonda de DNA específica para profilina.	41
3.3.	Preparación de sonda con marca radioactiva	42
3.4.	Caracterizaciones génicas.	43
3.4.1.	Experimento tipo Southern Blot.	43
3.4.2.	Electroforesis de Campos Alternos Transversales.	44
3.4.3.	Tamizaje a partir de una biblioteca genómica y biblioteca de cDNA de <i>T. cruzi</i> .	45
3.5.	Caracterización del RNAm.	45
3.5.1.	Northern Blot.	45
3.5.2.	Determinación de la vida media de RNAm.	46
3.5.3.	Determinación de los niveles de equilibrio de RNAm.	46
3.6.	Proteína recombinante.	47
3.6.1.	Subclonación del gen de profilina de <i>T. cruzi</i>	47
3.6.2.	Expresión de la proteína recombinante.	48
3.6.3.	Electroforesis de proteínas y Western Blot.	49
3.7.	Modelaje molecular.	50
4.	RESULTADOS.	51
4.1.	Obtención de la sonda homóloga de profilina	51
4.2.	Caracterización genómica.	52
4.3.	Obtención de una clona que contiene el gen de profilina.	53
4.4.	Expresión del RNAm	59
4.5.	Obtención de una proteína recombinante y un péptido recombinante	62
4.5.1.	Cultivos de expresión a menor escala.	65
4.6.	Análisis de secuencia y predicción de la estructura terciaria de profilina.	66
4.6.1.	Análisis de la secuencia deducida de aminoácidos.	66

4.6.2. Identificación de motivos conservados para los ligandos de profilina.	66
4.6.3. Predicción de la estructura terciaria.	69
5. DISCUSIÓN	73
6. CONCLUSIONES	78
7. PERSPECTIVAS	79
8. BIBLIOGRAFÍA	80

ABREVIATURAS UTILIZADAS.

3'-5'	En dirección del ácido nucleico del extremo 3' al 5'
5'-3'	En dirección del ácido nucleico del extremo 5' al 3'
aa	aminoácidos
°C	Grados Celsius
µg	Micro gramos
µl	Micro litro(s)
µM	Micro molar
µm	Micro metros
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietil-piro-carbonato
H	Horas
IPTG	Isopropilthio-β galactosidasa
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltones
LIT	Medio de cultivo de infusión de hígado y triptona.
M	Molar
Mb	Mega bases
ML	Fase media logarítmica.
Min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido(s)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Base
PIP	Fosfatidilinositoles
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato
PLP	Poli-L-prolina
RNA	Acido ribonucléico
RNAP	RNA polimerasa
RNA _m	RNA mensajero
RNA _r	RNA ribosomal
SL	Spliced leader o mini exón
TAFE	Electroforesis de campos alternos cruzados
UTR	Región no traducida
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura celular de <i>T. cruzi</i> .	13
Figura 2. <i>Triatoma sordida</i> y <i>Triatoma dimidiata</i> .	15
Figura 3. Ciclo de vida y estadios morfológicos.	16
Figura 4. Países en donde la enfermedad de Chagas es endémica.	17
Figura 5. Enfermedad de Chagas.	18
Figura 6. Expresión de RNAm en tripanosomátidos.	22
Figura 7. Estructura terciaria de profilina.	30
Figura 8. Ligandos de profilina.	32
Figura 9. Sistema de actina y proteínas de unión a actina en tripanosomátidos.	35
Figura 10. Secuencia de cDNA de profilina accesada AI034988.	51
Figura 11. Identificación y localización de regiones codificadoras para profilina en cromosomas de <i>T. cruzi</i> y en fragmentos de restricción.	52
Figura 12. Mapa de restricción de clona genómica que contiene la secuencia del gene de profilina.	54
Figura 13. Alineamiento de secuencia obtenida (PROF) con las secuencias homólogas accesadas en <i>T. cruzi</i> GeneDB	56
Figura 14. Diagrama del contexto genómico para las dos variantes alélicas de profilina.	58
Figura 15. Caracterización de la región 3' de profilina.	58
Figura 16. Expresión de profilina a nivel de mensajero y caracterización de sus sitios de procesamiento.	60
Figura 17. Curva de crecimiento de epimastigotes.	61
Figura 18. Cinética de decaimiento de mensajeros de profilina.	62
Figura 19. Oligonucleótidos diseñados en sitios de subclonación <i>Bam</i> HI.	63
Figura 20. Productos de la reacción de PCR.	64
Figura 21. Representación gráfica de las construcciones Rec1-pQE30 y Rec2-pQE30.	64
Figura 22. Evaluación de la expresión de proteínas recombinante de <i>T. cruzi</i> en <i>E. coli</i> .	65
Figura 23. Alineamiento de profilinas seleccionadas.	68
Figura 24. Alineamiento estructural entre profilina de <i>A. castellani</i> - <i>T. cruzi</i>	70
Figura 25. Residuos funcionales de interacción con los tres ligandos.	71
Figura 26. Validación externa de la predicción estructural de profilina de <i>T. cruzi</i> mediante el programa Pro-SA.	72
Figura 27. Organización genómica de la región codificadora de profilina incluyendo la información obtenida de los contigs identificados mediante el análisis de secuencia de la región río abajo de profilina.	74

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Residuos funcionales en profilina demostrados por mutagénesis y cristalografía.	33
Tabla II. Identificación de homólogos para proteínas de unión actina en el proyecto de genoma de los tripanosomátidos.	36
Tabla III. Vectores de clonación utilizados en este trabajo.	42
Tabla IV. Oligonucleótidos empleados para la subclonación de la proteína y el péptido recombinantes	48
Tabla V. Conservación de aminoácidos de profilina de <i>T.cruzi</i> involucrados en la unión a ligandos.	67
Tabla VI. Profilinas con estructura cristalográfica conocida (PDBs)	69

RESUMEN

Con el interés de ampliar nuestros estudios sobre el sistema de actina en *T. cruzi* y su regulación, iniciamos la caracterización molecular del gen de profilina. En eucariontes superiores es una de las proteínas de unión a actina monomérica 1:1 y su función está en la regulación de la polimerización de actina en microfilamentos. Se amplificó a partir de DNA genómico una sonda homóloga de 349 nt utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de una secuencia de expresión (EST) depositada en GenBank (AI034988-TENG0048 *T. cruzi*). Análisis de Blast de esta secuencia dentro de la base de datos del proyecto de genoma de *T. cruzi*, identificó dos *contigs* conteniendo las dos variantes haplotípicas que se sabe existen en la cepa CL-Brener (Esmeraldo y No Esmeraldo). Se utilizó la sonda homóloga para aislar un fragmento de 7.1 kb delimitado por *EcoR* I en una biblioteca genómica. Este fragmento contiene una secuencia de 2.1 kb río abajo del gen de profilina que se encuentra ausente en los *contigs* del proyecto de genoma de *T. cruzi*. Los datos de la secuencia fueron utilizados para ensamblar cinco *contigs* diferentes. El gen se expresa como un mensajero de 0.7 kb, tamaño suficiente para codificar para una proteína de 150 aa. Del análisis de los sitios de procesamiento del RNAm identificados al comparar con secuencias de las clonas genómica y cDNA, se determinó que las regiones no traducidas son de tamaño similar a las reportadas para otros RNAm en *T. cruzi*. El mensajero tiene una vida media de 3 h en fase media logarítmica y se demostró que el RNAm se estabiliza durante la fase estacionaria, como se ha detectado para otros genes de mantenimiento. Se subclonó el gen que codifica para la proteína y para un péptido recombinante en un vector de expresión. Sin embargo, no fue posible inducir su expresión. Se efectuó la predicción de la estructura terciaria de profilina de *T. cruzi* y se encontró que la estructura terciaria contiene las siete cadenas beta antiparalelas flanqueadas por cuatro alfa hélices típicas de las profilinas. Así mismo, se demostró que la inserción de 19 residuos hacia el extremo carboxilo de la proteína descrito en *T. brucei*, también se encuentra presente en *T. cruzi* y *Leishmania*. El papel fisiológico de esta inserción necesita ser estudiado.

ABSTRACT

To continue the study of the actin system and its regulation in *T.cruzi*, we began the molecular characterization of the profilin gene. In eukaryotes, profilin forms a 1:1 complex with monomeric actin that it is involved in the regulation of actin polymerization into filaments. A homologue gen probe of 349 nt, was amplified by PCR from genomic DNA using two primers designed on a EST sequence encoding for profilin and deposited in GenBank (accession number AI034988-TENG0048 *T.cruzi*). Blast analysis of this sequence in the *T. cruzi* Genome Database identified two contigs containing the two variant haplotypes known to exist in the CL-Brener strain (Esmeraldo and Non-Esmeraldo). The homologue probe was used to isolate a 7.1 kb-*EcoR* I delimited DNA fragment from a genomic library. This fragment contained a 2.1 Kb sequence downstream the profilin gene absent the *T. cruzi* Genome contigs. This data was used to assemble 5 different contigs. The profilin gen was expressed as a 0.7 kb RNA big enough to encode for a 150 amino acids protein. Genomic and cDNA sequence analysis allowed us to identify the precise location of the sequences involved in mRNA processing. The length of the 5' and 3' untranslated regions were within the expected range for *T. cruzi* mRNAs. The half-life of the transcript was 3 h in mid-log phase, but it was stabilized during stationary phase of growth, as it occurs with other housekeeping genes. Subcloning of a recombinants profilin and peptide in an expression vector was carried out. However it wasn't possible to detect protein expression. A predictive model of the tertiary structure of profilin *T.cruzi* was obtained and was demonstrated it presents seven beta sheets packed into antiparallels surrounded by four alpha helices characteristic of other profilins. We also demonstrated that a 19 aa insertion at the C terminus of *T.brucei* is also present in *T.cruzi* and *Leishmania*. The physiological role of this insertion remains to be determined.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los Cinetoplástidos.

Los cinetoplástidos son protozoarios flagelados que se caracterizan por la presencia de una estructura celular, el cinetoplasto. Esta estructura es una intrincada red de moléculas circulares de DNA mitocondrial que se localiza en la base del flagelo. Este orden se ha subdividido en tres familias: *Trypanosomatidae*, *Bodanidae* y *Cryptobiidae* (Stevens et al., 2001). Estos organismos pueden ser de vida libre; encontrarse en ambientes acuáticos; parasitar plantas, organismos vertebrados e invertebrados y pueden tener ciclos de vida mono o digenéticos (que incluyen invertebrados hematófagos). A pesar de estas diferencias se ha sugerido que estos organismos provienen de un ancestro de vida libre común (Wright et al., 1999).

1.2. Familia *Trypanosomatidae*.

La familia *Trypanosomatidae* se caracteriza por tener un solo flagelo y el cinetoplasto, a ella pertenecen tres especies de importancia médica: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*, cuyos genomas están secuenciados. Los tres parásitos presentan en común estructuras celulares de interés biológico (figura 1) entre las que se destacan:

Citoesqueleto: está constituido por un corset subpellicular, el axonema, el bastón paraflagelar, el cuerpo basal y la zona de adherencia del flagelo (De Souza, et al. 1999). El corset subpellicular esta compuesto por una red de microtúbulos entrelazados que se encuentran adosados a la membrana celular a la cual recubren casi en su totalidad, con excepción del área correspondiente al bolsillo flagelar. El flagelo sale del bolsillo flagelar, se dobla hacia delante permaneciendo adosado al cuerpo del parásito, dando la apariencia de una membrana ondulante y emerge en forma libre en su extremo anterior (Gull,

2003). Posee un axonema con una estructura básica similar a la de otros organismos flagelos, esto es un patrón de microtúbulos de 9+2 y una estructura filamentosa altamente organizada que lo acompaña en toda su longitud y que se denomina bastón paraflagelar. La longitud del flagelo varía de acuerdo al estadio del ciclo de vida del parásito, en amastigotes mide solamente 1µm, mientras que en epimastigotes y tripomastigotes llega a medir 20 µm (De Souza 2002).

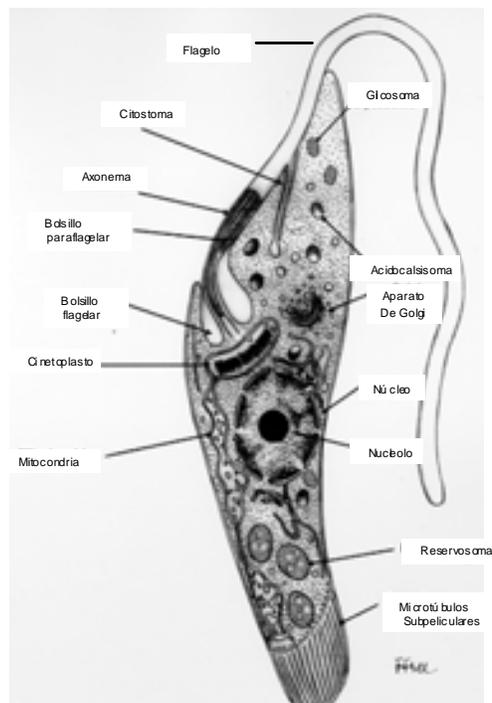


Figura 1. Estructura celular de T. cruzi. Figura que esquematiza algunas estructuras celulares, tomada de De Souza Mem Ins Oswaldo Cruz 94:17-36, 1999.

Bolsillo flagelar: es una invaginación de la membrana plasmática, carente de microtúbulos, desde donde emerge el flagelo y en donde se lleva a cabo el proceso de endocitosis. En epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, contiene una invaginación profunda de la membrana plasmática (la citofaringe) que puede llegar hasta la región nuclear. El orificio de salida se conoce como citostoma. Las moléculas endocitadas son internalizadas en el fondo de la citofaringe de donde se desprenden las vesículas endocíticas (Waghabi et al., 2005).

Reservosomas: estructuras vesiculares de membrana única que contienen lípidos y proteínas, que se originan a través de la fusión y maduración de vesículas endocíticas. Aquí se acumulan grandes cantidades de cruzipaina que es la principal proteinasa de cisteína presente en *T. cruzi*. Los reservosomas son organelos de reserva que son utilizados por los epimastigotes cuando se encuentran creciendo en un medio escaso de nutrientes (De Souza 2002).

Cinetoplasto: corresponde a una condensación de DNA localizada en el interior de la mitocondria única. Esta condensación se encuentra adyacente al cuerpo basal flagelar. El DNA mitocondrial consiste de una red altamente estructurada compuesta de moléculas circulares de DNA entrelazadas que reciben el nombre de maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos contienen los genes que codifican para los RNAr mitocondriales y para proteínas hidrofóbicas mitocondriales involucradas principalmente en el proceso de fosforilación oxidativa. Los minicírculos codifican para los RNA pequeños guía que controlan el proceso de edición de los mensajeros transcritos en los maxicírculos (Estévez, 1999). Los RNA de transferencia mitocondriales se codifican en el núcleo y se importan a la mitocondria.

Glicosoma: es el peroxisoma de los tripanosomátidos. Se caracteriza por contener enzimas catalasas, oxidasas, además de las enzimas glicolíticas involucradas en la conversión de glucosa a 3-fosfatogliceraldehído (De Souza 2002).

Los tres tripanosomátidos patógenos, comparten características generales pero cada uno es transmitido por diferentes vectores y tienen características particulares durante su ciclo de vida. Debido a que el modelo de estudio aquí trabajado es *T. cruzi*, se describe con detalle la enfermedad que este produce, su ciclo de vida, y aspectos moleculares de su organización y expresión génica.

1.3. *Trypanosoma cruzi*.

Protozooario, parásito y agente causal de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, se distribuye exclusivamente en el Continente Americano. El ciclo de vida incluye dos huéspedes: insectos hematófagos (García y Azambuja, 1991) y a vertebrados (Miles, 1978). Los insectos transmisores de la enfermedad de Chagas pertenecen a la familia Hemiptera Reduviidae, subfamilia *Triatominae* (figura 2).



Figura 2. *Triatoma sordida* y *Triatoma dimidiata*. Dos de las especies responsables de la transmisión de la enfermedad de Chagas (www.sucen.sp.gov.br/.../chagas/t.sordida_gde.jpg y www.mex.ops_oms.org/.../chagas/t_dimidiata.jpg)

1.3.1. Ciclo de vida.

En México existen de 30 a 34 especies de estas chinches conocidas como “besuconas”, “hociconas” o “trompudas” que son de hábitat selvático. Algunas especies se han adaptado a los ambientes peri domésticos, es decir en convivencia con los humanos lo que facilita su transmisión (Sandoval *et al.*, 2008). El ciclo de vida (figura 3) se inicia cuando una chinche se alimenta por la picadura y succión de la sangre de un vertebrado infectado con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*. En el intestino se diferencian a epimastigotes, los cuales se dividen repetidamente por un proceso de fisión binaria (Zeledón *et al.*,

1997). Al llegar a la cloaca una cierta proporción de epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos; los cuales son eliminados con las heces al momento de alimentarse el insecto. Los tripomastigotes entran al vertebrado a través de excoriaciones de la piel y mucosas, invadiendo después las células hospederas. Dentro de las células, los tripomastigotes se redondean para formar amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria para posteriormente transformarse en tripomastigotes sanguíneos. Esta forma de tripomastigote se libera al torrente sanguíneo por la lisis de la célula parasitada con posibilidad de infectar otras células o de nuevo infectar un insecto triatómino, cerrando así, el ciclo de vida aquí descrito.

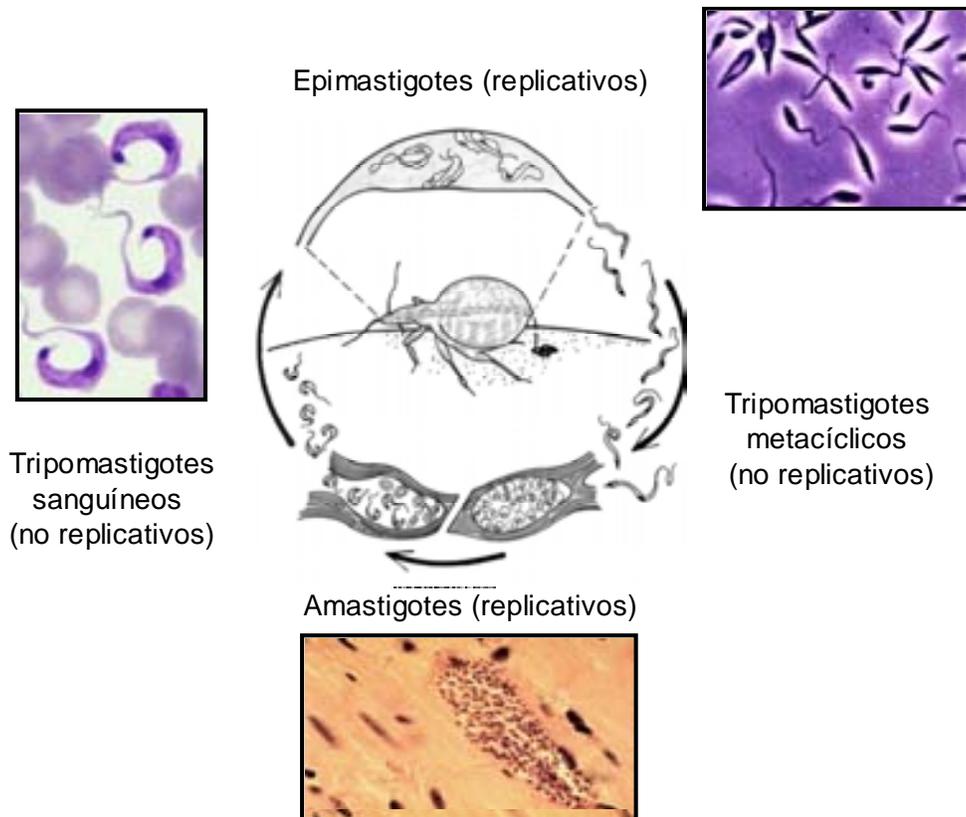


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi* y estadios morfológicos. Los tres diferentes estadios según su morfología microscópica se incluyen en el recuadro: epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes.

1.3.2 Enfermedad de Chagas.

En Latinoamérica, esta enfermedad representa un serio problema de salud pública y se estima que existen aproximadamente 100 millones (25 % de los habitantes de Latinoamérica) de personas en riesgo de infectarse, y entre 16 y 18 millones de individuos ya infectados (figura 4) (WHO, 2002).



Figura 4. Países en donde la enfermedad de Chagas es endémica.

www.dndi.org.br/imagens/mapa_doenca_chagas.jpg

La enfermedad asociada con la infección de *T. cruzi* presenta tres etapas en humanos. La fase aguda, la cual aparece poco después de la infección, se caracteriza por una alta parasitemia y una inflamación severa en el sitio de entrada del parásito conocida como Chagoma. Cuando la entrada es a través de la mucosa oftálmica la inflamación resultante recibe el nombre de signo de Romana, figura 5A. La etapa intermedia puede durar de 5-40 años, tiempo en donde la respuesta inmune reduce la cantidad de tripanosomátidos en

circulación, por lo que es asintomática. La fase crónica se desarrolla en 30-40 % de los pacientes infectados, los órganos más afectados son: el corazón (cardiopatía chagásica) (figura 5B), intestino y tejido nervioso (Parada *et al*, 1997).

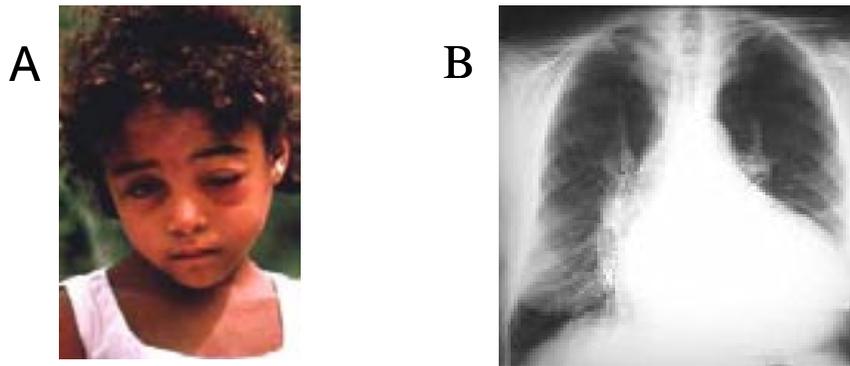


Figura 5. Enfermedad de Chagas. A) Infante con signo de Romaña, inflamación peri-oftálmica que ocurre como consecuencia de la infección vía mucosa ocular www.travelclinic.it/image/Trip03.jpg. B) Radiografía de tórax que muestra crecimiento del corazón secundario a enfermedad de Chagas www.fac.org.ar/fec/chagas/c11mitel/mitel2.jpg

La ruta de infección principal se establece a través de la transmisión por el vector, pero una segunda ruta se presenta por transfusión sanguínea en zonas urbanas. La seroprevalencia en Bancos de Sangre regionales de México anti-*T. cruzi* es de 0.75-1.5 % (Guzmán-Bracho, 2001). En Estados Unidos, el 0-0.5 % de la población presenta anticuerpos contra el parásito, la mayoría inmigrantes de áreas endémicas de Latinoamérica que residen en ese país (Buekens *et al.* 2007). La tercera ruta de infección se da por transfusión materno-fetal de *T. cruzi*, en madres embarazadas crónicamente infectadas. En dos regiones endémicas de México (Chiapas y Veracruz) se detectó que el 4.1 % de las mujeres embarazadas eran seropositivas para *T. cruzi*, sin embargo, no se encontró una transmisión vertical (Olivera, 2006).

1.3.3 El proyecto de genoma de *T. cruzi* (TcruziDB. <http://TcruziDB.org>)

En Julio de 2005 la revista Science publicó los genomas de los tres principales tripanosomátidos de importancia médica: *Leishmania major* (Ivens et al. 2005), *Trypanosoma brucei* (Berriman et al., 2005) y *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005a). Estas publicaciones fueron acompañadas de un artículo de genómica comparativa entre estas especies (El-Sayed et al., 2005b). *T. cruzi* cepa CL Brener fue seleccionada para el proyecto de genoma por ser la mejor caracterizada experimentalmente (Zingales et al., 1997). Para *T. cruzi* se reconocen dos linajes genéticos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Nunes, 1997). *T. cruzi* I esta asociado con el ciclo de transmisión selvático e infección a marsupiales. *T. cruzi* II esta asociado al ciclo de transmisión doméstica e infección a mamíferos, de este linaje se agruparon cinco subgrupos: IIa, IIb, IIc, IId y IIE. Ya empezado el proyecto de genoma se hizo evidente que la cepa CL Brener es un híbrido derivado del subgrupo IIb y del subgrupo IIc (que a su vez híbrido derivado de *T. cruzi* I y *T. cruzi* II). Durante el ensamblaje del genoma se identificó una alta variación alélicas. El análisis comparativo de las secuencias identificadas con las del genoma de la cepa Esmeraldo (subgrupo IIb) permitió distinguir dos haplotipos los cuales fueron denominados Esmeraldo y No-Esmeraldo. De los 22,570 genes identificados, 6159 corresponden al haplotipo Esmeraldo, 6043 No Esmeraldo y 10,368 representan genes que no pudieron ser asignados a un haplotipo particular. En promedio la divergencia entre los dos haplotipos es de 5.4%, y las regiones codificadoras son más conservadas que las intergénicas (una diferencia del 2.2%). Las diferencias en el número de genes asignados específicamente a un haplotipo (6159 vs. 6043) se deben, probablemente, a la cantidad de copias de genes específicos encontrados en cada uno de ellos. Por ejemplo, la actina convencional, que previamente hemos caracterizado (Cevallos et al., 2003), se encuentra codificada por tres genes, dos de ellos están presentes en un alelo y uno en el otro. Otro ejemplo descrito en nuestro laboratorio es el gen que codifica para la proteína ribosomal S4 que

también se encuentra codificada por tres genes, dos se encuentran en un alelo y el tercero en el otro (Pérez-Escobar et al. 2007).

Con respecto al estudio de la expresión proteómica de *T. cruzi* (Atwood III et al. 2005) describe que el 30 % de los genes analizados que codifican para proteínas son expresados en todos los estadios examinados, otros no se expresan.

1.3.4 Organización genómica.

En tripanosomátidos, las regiones codificadoras están organizadas en “tándem” separadas por regiones intergénicas pequeñas de entre 100 - 400 nucleótidos y con la misma polaridad para genes que se transcriben policistricamente (Stiles et al. 1999). La presencia de “clusters”, grupo de genes con la misma orientación para su transcripción, la mayoría correspondientes a genes de mantenimiento, se ha sugerido que funciona como un mecanismo que permite incrementar la abundancia de los transcritos de aquellas proteínas que son altamente expresadas. En cambio los genes del miniexón o “spliced leader”, que proporcionan el casquete (“cap” nucleótido 7-metilguanilato) durante el procesamiento de los RNA mensajeros, se encuentran en unidades de transcripción monocistrica con su propio promotor localizado justo corriente arriba de cada uno de los genes (Gilinger et al., 2001), agrupados en tándem con aproximadamente 200 genes (Agabian et al. 1990) y codificados en una región particular del genoma.

1.3.5. Transcripción.

Al igual que los eucariontes superiores, la transcripción de los genes en tripanosomátidos se lleva a cabo por tres tipos de RNA polimerasas (RNAP). La RNAP I transcribe los genes RNA ribosomales a excepción del 5S, la RNAP II transcribe los genes codificadores para proteínas y el spliced leader que confiere

el cap a todos los mensajeros, y finalmente la RNAP III transcribe los RNA de transferencia, el RNA 5S y los RNA nucleolares pequeños (Geiduschek et al. 2001).

El promotor para la RNAP I, se encuentra localizado a 1.8 kb del cistrón ribosomal y ha sido caracterizado en el laboratorio (Figueroa-Angulo, et al., 2006). También se ha caracterizado el promotor de RNAP II que determina la transcripción del miniexón (Luo et al., 1999; Gilinger y Bellofatto, 2001). En cambio, no se ha podido detectar la presencia de promotores que medien la transcripción de las regiones codificadoras para proteínas. Sin embargo, se sabe que estos genes se transcriben de manera policistrónica, dando lugar a un transcrito primario, el cual es procesado generando los mensajeros maduros y cuyos niveles son regulados post-transcripcionalmente. Para el promotor de RNAP III se han descrito algunos elementos y cajas que regulan la transcripción (Hernández-Rivas et al., 2007).

1.3.6 Procesamiento de los RNAm.

Al igual que en otros eucariontes cada RNAm de tripanosomas es cortado a partir de un precursor y modificado en los extremos 5' y 3'. En tripanosomas las unidades policistrónicas son procesadas co-transcripcionalmente a través de los mecanismos de “trans-splicing” y poliadenilación (figura 6) generando RNA mensajeros maduros que son traducidos. El trans-splicing es un mecanismo mediante el cual el extremo 5' de todos los RNAm es procesado por la inserción de un pequeño RNA de ≈ 39 nucleótidos transcrito en otro sitio del genoma (miniexón o “spliced leader”) y que confiere el cap (Boothroyd et al., 1982). En estos organismos el mecanismo de “trans-splicing” y poliadenilación parecen estar acoplados, pues se dan en un rango acotado de distancia de ~ 100 -400 nucleótidos, dependiendo de la especie (LeBowitz et al., 1993), y ambos eventos son dependientes de una región rica en polipirimidinas localizadas dentro de las regiones intergénicas (Campos et al., 2008). Mientras no ha sido posible identificar una señal de poliadenilación río arriba de la región rica en

polipirimidinas, si se ha podido identificar al dinucleótido AG río abajo de esta región como el sitio aceptor del SL (Huang et al., 1991; Schurch et al., 1994). En un estudio *in silico* de los UTRs (regiones no traducidas) de *T. cruzi* se estimó que las regiones no traducidas en el extremo 5' presentan una longitud media de 35 nucleótidos y las del extremo 3' una longitud media de 137 nucleótidos. Casi el 90% de los 5' UTR tienen menos de 50 nt y el 91% de los 3' UTR son menores de 500 nt (Campos et al., 2008). El tamaño más largo de los 3' UTR es congruente con otros estudio en los que se identificaron secuencias regulatorias río abajo de la región codificadora (Silva et al., 2006). Muchos de estos elementos regulatorios analizados son responsables en controlar la estabilidad del RNAm, lo que constituye el principal mecanismo involucrado en la expresión diferencial en *T. cruzi* (Haile y Papadopoulou, 2007).

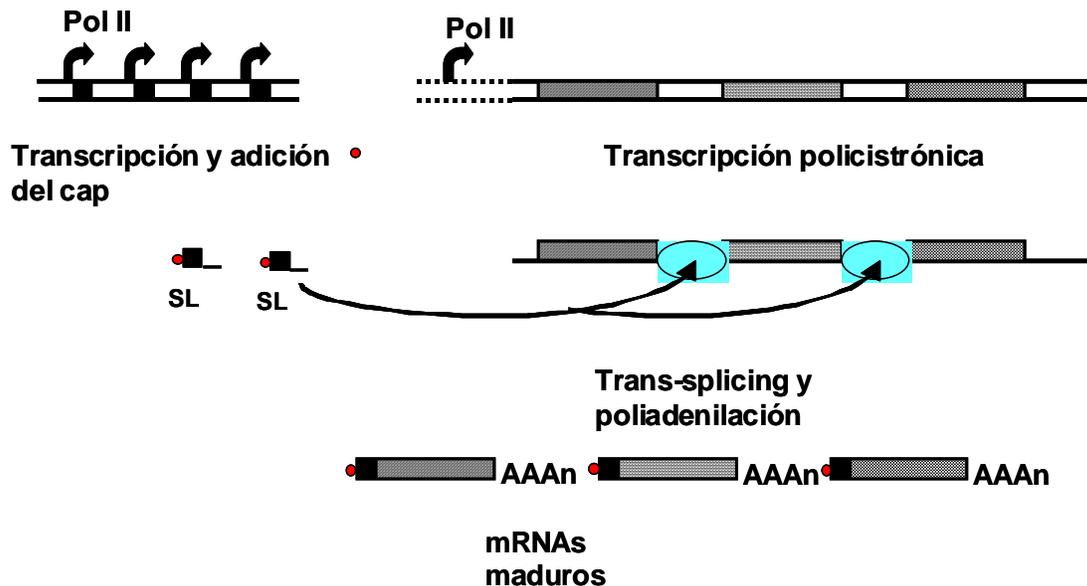


Figura 6. Expresión de RNAm en tripanosomátidos. Los RNAm maduros se producen por la unión de transcritos generados en dos unidades de transcripción. Los genes del spliced leader con su promotor individual y la región codificadora de los mensajeros que generalmente se producen policistrónicamente. Se destaca la presencia de un cap (●) presente en el extremo 5' del RNAm en el SL. El trans-splicing y la poliadenilación son procesos acoplados que ocurren en la región intergénica transcrita en el pre-RNAm policistrónico. Genes de spliced leader: cajas negras, SL; cap, punto rojo; promotores, flechas; el tracto de pirimidinas y sitio aceptor de spliced AG, ambos dentro de la burbuja azul. Tomado de tesis Perez-Escobar 2008.

1.4. Citoesqueleto en Eucariontes.

El citoesqueleto en eucariontes superiores es una estructura celular compuesta principalmente de tres tipos de fibras: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Estas fibras se forman por la polimerización de subunidades proteicas. Los microfilamentos y microtúbulos se dan por la polimerización de subunidades de actina y tubulina respectivamente, en cuanto a los componentes de los filamentos intermedios, tienden a ser variables de un tipo celular a otro, de una especie animal a otra y de condiciones fisiológicas.

1.4.1. Citoesqueleto de Actina.

Las principales funciones del citoesqueleto de actina están relacionadas con la motilidad celular y cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. También participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares, es esencial para algunas actividades contráctiles y para controlar las interacciones celulares, la adhesión molecular, y el transporte intracelular (Alberts et al., 2002).

1.4.1.1 Actina.

Actina es una proteína intracelular abundante en todas las células eucariontes conformando el 5% al 10% del total de proteínas. En promedio contiene 375 aminoácidos y un peso molecular ≈ 42 kDa. En los vertebrados se tienen identificadas seis isoformas de actina codificadas por una familia de genes y con una distribución tejido específica: actina α de músculo esquelético, actina α de músculo cardíaco, actina α de músculo liso de aorta, actina α de músculo liso de estómago y, las actinas citoplásmicas β y γ presentes en todas las células. En la actualidad, actina es reconocida como una de las proteínas más conservadas, abundantes y versátiles de las células eucariontes. Las actinas más divergentes como la de los protozoarios, tienen mayor parecido a la

γ actina citoplásmica de vertebrados, compartiendo similitudes del 65% al 70%. Los datos cristalográficos indican que actina es una proteína globular conformada por dos dominios conectados por una bisagra. La molécula presenta una hendidura que forma sitios de unión tanto para el catión divalente (generalmente Mg^{2+} en las células) como para un nucleótido ATP o ADP. Actina tiene la actividad intrínseca de ATPasa convierte ATP-actina en ADP-actina y libera el fosfato (Paavilainen et al., 2004). Los dominios de actina llamados originalmente como grande y pequeño (aunque ahora se sabe que tienen casi el mismo tamaño) son divididos en subdominios. El dominio pequeño esta compuesto de los subdominios 1 y 2 mientras que el dominio grande esta compuesto de los subdominios 3 y 4.

La mayoría de las funciones de actina requieren la formación de filamentos, también conocidos como microfilamentos. La actina presente en estas estructuras recibe el nombre de actina F. A la forma monomérica de la proteína se le llama actina globular o actina G (Alberts et al., 2002). Los microfilamentos son fibras flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro y varios micrómetros de longitud. Cada microfilamento está constituido por dos hebras de polímeros de actina con la misma polaridad, que se enrollan para formar una estructura helicoidal doble, entrecruzándose las hebras cada 13 subunidades. Cada monómero de actina tiene sitios de unión en su superficie que le permiten asociarse a través de una interacción cabeza-cola con otros dos monómeros generando el filamento helical. Debido a que todos los monómeros de actina están orientados en la misma dirección se pueden distinguir dos extremos: más y menos. Esta polaridad se distingue fácilmente con la “decoración” con fragmentos S1 de miosina los cuales se unen a las moléculas de actina en el filamento formando una serie de proyecciones laterales dirigidas en una dirección, que a nivel de microscopía electrónica adquiere la apariencia de flecha, lo que da orientación al filamento. A partir de este ensayo se nombraron extremo punteado y barbado a los extremos más y menos,

respectivamente, del filamento. La polaridad del microfilamento es importante para su ensamblaje (Alberts et al., 2002).

Los estudios de polimerización *in vitro* de actina globular purificada han aportado datos importantes para describir a los filamentos ensamblados espontáneamente. El primer paso en la polimerización de actina, llamado nucleación, es la formación de un agregado de tres monómeros de actina unidos a ATP. *In vitro* es posible alongar estos complejos por la adición reversible de monómeros en ambos extremos, sin embargo, el extremo más crece cinco veces más rápido que el extremo menos. Actina tiene actividad intrínseca de ATPasa, que resulta en la conversión de ATP-actina a ADP-actina después del ensamblaje del filamento. Sin embargo, los monómeros con ATP se unen más fácilmente al filamento que aquellos que contienen ADP. Existe un equilibrio entre los monómeros y los filamentos dependiendo de la concentración de los monómeros libres: la velocidad con la cual un monómero se incorpora al filamento es proporcional a su concentración. Se define como concentración crítica a la concentración de monómeros con la cual la velocidad de ensamblaje es igual que la de desensamblaje (Yarmola et al. 2006).

1.4.1.2. Proteínas de unión a actina (ABPs).

En las células el proceso de polimerización de actina esta regulado por una gran variedad de proteínas de unión a actina (ABPs). Las actividades de las ABPs están controladas por varias rutas de señalización celular. Muchas de estas proteínas reguladoras de actina son específicas de determinados *phyla* y por lo tanto están involucradas en procesos diferenciados y peculiares en dichos grupos. Sin embargo, un subgrupo de seis clases de proteínas de unión a actina monomérica están conservadas entre los eucariontes, de tal manera, que parece tener funciones de regulación en procesos citoesqueléticos comunes a todos los tipos celulares (Paavilainen et al., 2004). En organismos unicelulares, como las levaduras, típicamente sólo se tiene una isoforma de cada una de las seis clases

de ABPs de unión a monómeros de actina, mientras que organismos multicelulares se encuentran varias isoformas de tejido específico. Dado que este grupo de proteínas son las que se encuentran filogenéticamente conservadas se cree que son las proteínas primordiales en la regulación de la concentración citoplasmática de actina monomérica (Paavilainen, *et al.* 2004). Las seis clases de proteínas, que se encuentran conservadas en organismos eucariontes son profilina, twinfilina, ADF/cofilina, Srv2/proteína asociada a ciclasa (CAP), la proteína del Síndrome de Wiscott-Aldrich (WASP)/familia WASP homólogo a verprolina (WAVE) y la familia de proteínas verprolina y proteína de interacción WASP.

La nucleación del filamento de actina se puede llevar a cabo a través de tres tipos de mecanismos mediados cada uno de ellos por las proteínas Spire, forminas y el complejo Arp2/3. Este último complejo se activa por una familia de proteínas que actúan como intermediarios: WASP y WAVE. Algunas ABPs interactúan con filamentos de actina (F-actina) para formación de haces o uniones cruzadas; o bien, se unen a los extremos barbados bloqueando el ensamblaje (capping como CapG y CapZ). Otras proteínas de unión actina regulan la longitud de los filamentos y el recambio de los monómeros ya sea al cortarlas en piezas cortas, como gelsolina y severina; o bien favoreciendo la despolimerización de los filamentos en los extremos puntuales por ejemplo ADF/cofilina (Paavilainen *et al.* 2004).

1.4.1.3 Vías de señalización.

La dinámica del citoesqueleto de actina depende de señales extracelulares e intracelulares. Algunas de estas señales se establecen por la acción de lípidos inositoles fosforilados, que al interactuar con una variedad de ABPs, indirectamente tienen un efecto en el ensamblaje de actina estimulándolo o inhibiéndolo. En términos generales los fosfatidilinositoles (PIPs) y los productos de su metabolismo juegan un papel crítico en transducción de señales

en la regulación del citoesqueleto de actina, en la fisión y fusión de membrana, así como en la expresión de genes. Los PIPs se localizan en el aparato de Golgi, endosomas, retículo endoplásmico y estructuras electrodensas dentro del núcleo (Watt et al. 2002). Existen varias especies químicas, la base principal es un inositol-1-fosfato ligado por un grupo fosfato al diacilglicerol, generándose por permutación del sitio fosforilado del grupo inositol. Los PIPs interactúan con proteínas de membrana para ser reclutados y anclarse a la membrana, pero pueden tener interacciones adicionales incluyendo con proteínas de unión actina. La molécula fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PIP₂] es importante en la regulación de la dinámica de actina y es sintetizada por tres rutas. La primera por fosforilación de un fosfatidil inositol-(4)P en la posición 5', por la fosfato cinasa-fosfoinositol tipo I. La segunda ruta por la fosforilación del fosfatidil inositol-(5)P en la posición 4' por la fosfato cinasa-fosfoinositol tipo II. Finalmente se pueden generar por la desfosforilación de PIP₃ por la fosfatasa 3'.

En fagocitos el PIP₂ modula la polimerización de actina al incrementar el número de microfilamentos con extremos barbados libres y promover su formación *de novo*, a través, de la activación/inactivación de proteínas de unión a actina como WASP y profilina. La interacción de PIP₂ con proteínas de membrana puede modular el anclaje de los filamentos de actina a la membrana plasmática durante la ingestión de la fagocitosis. Además PIP₂ interactúa directamente con proteínas intracelulares, incluyendo reguladores del citoesqueleto de actina, y es sustrato de fosfoinositol cinasa para producir PIP₃ (Hilpelä et al. 2004).

1.5. Profilina.

1.5.1. Generalidades

La profilinas son pequeñas proteínas (12 a 15 kDa), cuya función es promover el ensamblaje de actina en presencia de los extremos barbados de los filamentos (Pantolini et al., 1993), o bien, secuestrar monómeros de actina en ausencia de los mismos (Pollard, 1986). Profilina puede participar en modular la

cantidad de actina-ATP libre, al favorecer el recambio de ADP por ATP (Goldschmidt-Clemont, 1992; Carlier et al., 1993). Mas aún, profilina es capaz de unirse a otras proteínas así como fosfatidilinositol, y ligar así las rutas de señalización con el sistema de actina (Witke, 2004). Aún cuando la mayoría de las profilinas solo tienen 25% de similitud en secuencia de aminoácidos, éstas se encuentran conservadas bioquímicamente y estructuralmente (Thorn et al., 1997).

Se ha demostrado que la ausencia de profilina provoca que procesos que dependen de actina (como la citocinesis y el crecimiento celular polarizado) no se lleven a cabo como se ha documentado en *Dictyostelium*, levaduras y células de mamífero (Witke, 2004).

1.5.2. Isoformas de profilina.

Los genomas de la mayor parte de organismos analizados, contienen familias génicas pequeñas que codifican diferentes isoformas de profilina y varían en número de acuerdo a la complejidad del organismo. El hongo *Dictyostelium discoideum* expresa tres isoformas de profilina bioquímica y funcionalmente diferentes (Arasada et al. 2007). En vertebrados existen cuatro isoformas que difieren en secuencia y presentan funciones tejido específico (Lambrechts et al., 2000). Aún cuando por secuencia son altamente divergentes, las isoformas I, II y III son específicas a vertebrados mientras que la profilina isoforma IV difiere de las anteriores siendo similar a la profilina de organismos invertebrados (Polet et al., 2007). En plantas las profilinas, primero descritas por el interés como alérgeno (Valenta et al. 1991), presentan isoformas con menor divergencia de secuencias (Kovar et al., 2000). Su función biológica propuesta es la participación en la germinación del polen al regular, junto con otras proteínas de unión actina, la estructura citoesquelética de actina y el crecimiento del tubo polínico que es la emanación del citoplasma a través del cual migran los núcleos masculinos en dirección al gameto femenino (McCurdy

et al., 2001). En granos de polen no germinados, profilina puede secuestrar G-actina y, bajo estímulos como la hidratación del polen y/o germinación, se libera actina para su polimerización por un mecanismo desconocido de des-secuestación (Tiwari et al., 1988). En humano a pesar de las diferencias en secuencia de la isoforma I y II de profilina las propiedades bioquímicas de ambas son extremadamente bien conservadas (Polet et al., 2007)

Se sabe poco de las modificaciones postransduccionales que puedan tener las profilinas y sus consecuencias funcionales. En plantas se ha reportado la presencia de isoformas secundarias a la fosforilación de tirosinas tanto en profilina I como de profilina II (Guillén et al., 1999). Posteriormente este grupo reportó que la fosfoinositol 3-cinasa es capaz de unirse a profilina dependiendo del estado de fosforilación de las tirosinas cercanas a la región de unión a PLP de la profilina del frijol, lo que puede influir en la dinámica de ensamblaje de actina (Aparicio-Fabre et al. 2006). En mamíferos se ha reportado la presencia de profilina fosforilada particularmente en la serina 137 la cual parece estar mediada por Proteína cinasa C (Vemuri et al. 2001 y Sathish et al. 2003) Sin embargo, a diferencia de las tirosinas involucradas con la unión a PLP la ser-137 parece estar presente solo en mamíferos y no en las profilinas en general..

1.5.3 Estructura de profilina

Uno de los criterios de identificación para una proteína y predecir su función se basa en su estructura secundaria y terciaria (Jockusch et al. 2007). La estructura terciaria de profilina está conservada desde *Acanthamoeba* hasta mamíferos (figura 7), muestra cuatro α hélices una de ellas en el extremo amino y una más en la región carboxilo adyacentes una de otra en un arreglo antiparalelo y de localización cercana a la superficie de la profilina. Cabe resaltar que este arreglo crea un surco conservado para interactuar con un tipo de ligando, como péptidos ricos en prolina (Mahoney et al, 1998). Además

contiene siete cadenas β -plegadas empaquetadas y rodeadas de las α hélices formando un centro compactado (Federov, 1997).

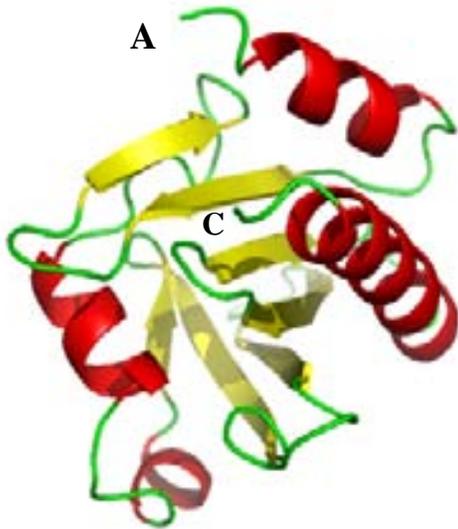


Figura 7. Estructura terciaria de profilina. La figura fue generada al utilizar el programa Py-mol empleando el PDB 1pne, profilina bovina. Las estructuras secundarias α -hélice, en rojo y β -plegadas, en amarillo.

1.5.4 Ligandos de unión a profilina.

Otro de los criterios aceptados para definir profilina es su capacidad de interactuar con tres clases de ligandos (figura 8):

A) Un sitio de unión a actina expuesto en la superficie (Schutt et al., 1993), que también es capaz de interactuar con proteínas relacionadas a actina (ARPs) (Machesky et.al, 1994). Los sitios de unión a actina en profilina se han determinado por cristalografía de rayos X del complejo profilina y actina- β de bovino. Los residuos que participan en el sitio de unión actina son pobremente conservados y el contacto comprende las regiones en profilina localizadas en la alfa hélice 3, porción amino terminal de la hélice 4 y las cadenas beta 4, 5 y 6. Estas regiones mantienen contacto con los subdominios 1 y 3 de actina. Schutt et al. (1993) identificaron que veintiún aminoácidos contribuyen a este contacto el cual se dividió en dos partes. La primera parte involucra los residuos E82, V118, H119, G121, M122, N124, L125, Y128 y E129 que interactúan con el subdominio 1 de β -actina. La segunda parte incluyen los residuos F59, V60, N61, L69, S71, V72, I73, R74,

R88, L90, T97 y N99 que interactúan con el subdominio 3. Eads et al. (1998) determinaron los sitios de unión actina de profilina de *S. cerevisiae* basados en su estructura cristalográfica y relacionándola a los sitios descritos por Schutt (ver tabla I). Además se identificaron los aminoácidos correspondientes que llevan a cabo esta interacción en profilina de humano.

B) Un dominio de unión a regiones ricas en L-prolina. Varias proteínas involucradas en la nucleación de los filamentos de actina y que se sabe interactúan con las profilinas, como forminas (Pruyne et.al, 2002), miembros de Ena/VASP (Harbeck et.al 2000) y la familia de WASP/WAVE (Stradal et.al, 2004), contienen motivos ricos en prolina diferenciados como una cadena de seis a diez residuos consecutivos de este aminoácido. En profilina, este sitio está conformado por un parche hidrofóbico en la superficie de la proteína en el cual se identifican varios aminoácidos aromáticos, los cuales forman la llamada “escalera aromática”. Estos aminoácidos (W_3 , Y_6 , W_{31} , H/Y_{133} , Y_{139}), son los que establecen el contacto directo con los residuos de prolina presentes en los diversos ligandos. El resto de los aminoácidos conservados (I_{21} G_{23} A_{32} L_{134}) son necesarios para mantener la estructura y orientación de la escalera aromática. Thorn et al. (1997) reportaron que de los 18 residuos conservados en más del 80% de las profilinas, casi la mitad (W_3 , Y_6 , I_{21} , G_{23} , W_{31} , A_{32} , H/Y_{133} , L_{134} , Y_{139}) se encuentran localizados en este parche hidrofóbico en la superficie de profilina, que es distinto del sitio de unión a actina. Esta región es la responsable de la unión a ligandos con regiones ricas en prolina.

C) Un dominio de unión a lípidos de fosfatidilinositol. Estudios funcionales *in vitro* han demostrado la capacidad de los fosfatidil inosoles, en especial PIP_2 , de unirse a profilina. Cuando PIP_2 está unido a ella no puede ser hidrolizado por la fosfolipasa C- γ . Sin embargo, cuando esta fosfolipasa es activada mediante su fosforilación secundaria a estímulos externos, entonces si es capaz de hidrolizar el PIP_2 liberando a profilina. Se sabe que la unión

de PIP₂ con profilina inhibe la formación de complejos profilina:actina por lo que se ha postulado que los fosfatidil inosoles secuestran a profilina en condiciones basales. Por lo tanto, los niveles de PIP₂ regulan la actividad de profilina, a niveles altos previene su asociación con actina y a niveles bajos se favorece la unión a actina. Los mecanismos responsables del desplazamiento de actina por PIP₂ no se conocen ni tampoco se han identificado todos los aminoácidos de profilina involucrados en la asociación PIP₂:profilina. En 1992, Yu et al. propusieron a los residuos 126-136 de profilina como la región probable de interacción dada la gran similitud de estos aminoácidos con los presentes en los motivos de unión a PIP₂ demostrados en gelsolina. Además, se ha demostrado que la mutación del residuo D8 resulta en un aumento en la afinidad de profilina por PIP₂ mientras que la mutación de R88 la disminuye (Sohn et al., 1995). Lambrechts et al. en el 2002 demostraron que la arginina 136 también contribuye a la unión de PIP₂ con profilina y que las dobles mutantes en R88 y R136 tenían un efecto aditivo en su capacidad de unir PIP₂.

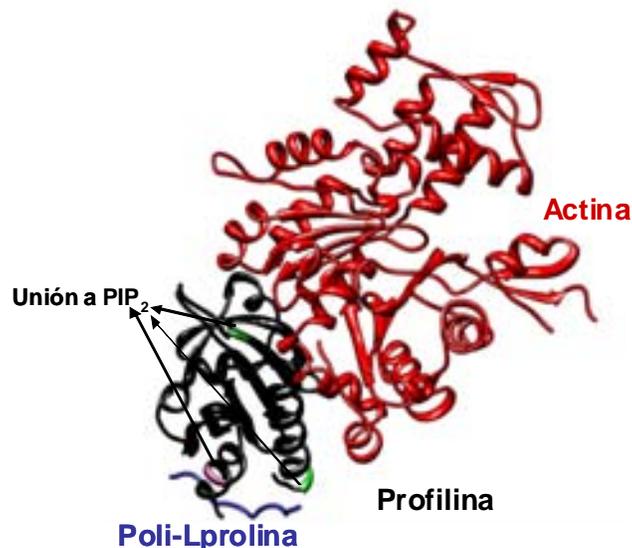


Figura 8. **Ligandos de profilina.** Estructura del complejo profilina:actina de humano formando complejo con un segmento poli L- prolina de VASP, PDB ID:2pav (Ferron et al., 2007) Profilina I en negro, actina en rojo y el fragmento de prolinas en azul. Profilina denota residuos de interacción con PIP₂ reportados por Shohn et al., 1995 (verde y rosa). La figura fue generada por el programa CHIMERA (Pettersen et al., 2004).

Tabla I: Residuos funcionales en profilina demostrados por mutagénesis y cristalografía.

Especie	Residuo	Función*	Referencia bibliográfica
<i>S.cerevisiae</i>	S2	Parche hidrofóbico-PLP	Wolven et al. 2000
Humano	W3	unión a PLP	Cedergren-Zeppezauer 1994; Schlüter K. et.al.,1998 ; Wolven et al. 2000
<i>S.cerevisiae</i>	Q4	Parche hidrofóbico-PLP	Wolven et al. 2000
Humano	Y6	unión a PLP	Schlüter K. et al.,1998
Humano	D8	unión a PIP2 y PLP	Sohn et. al. 1995, Schlüter K. et.al. 1998; Wolven et al. 2000
<i>Tetrahymena</i>	A20	Conservación estructura	Wilkes et al. 2000
<i>Tetrahymena</i>	I22	Parche hidrofóbico-PLP	Thorn et al 1997; Wilkes et al. 2000
<i>Tetrahymena</i>	G24	Parche hidrofóbico-PLP	Wilkes et al. 2000
<i>S.cerevisiae</i>	W30	unión a PLP	Thorn et al 1997; Wilkes et al. 2000; Wolven et al. 2000
<i>A.thaliana</i>	W31	unión a PLP	Thorn et al 1997
<i>S.pombe</i>	E43	Conservación estructura	Thorn et al 1997; Schlüter K. et al. 1998
<i>Bovino</i>	F59	unión a actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc Q56; Hs Y59) Schlüter K. et al.
<i>Bovino</i>	V60	unión a actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc S57; Hs V60) Schlüter K. et.al.
<i>Bovino</i>	N61	unión a actina	Schutt et al. 1993
<i>A. thaliana</i>	G62	Conservación estructura	Thorn et al 1997
<i>A. thaliana</i>	G67	Conservación estructura	Thorn et al 1997
<i>Bovino</i>	K69	unión a actina	Schutt et al. 1993
<i>Bovino</i>	S71	unión a actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc M68; Hs S71)
<i>Bovino</i>	V72	unión a actina	Schutt et al. 1993
<i>Bovino</i>	I73	unión a actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc L70; Hs I73)
<i>Bovino</i>	R74	unión actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc R71; Hs R74)
<i>Bovino</i>	E82	unión actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc no; Hs E82)
<i>Bovino</i>	R88	unión actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc R80; Hs R88)
Humano	R88	unión actina y PIP2	Sohn et. al.,1995
<i>Bovino</i>	K90	unión a actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc no; Hs K90)
<i>Bovino</i>	T97	unión a actina	Shutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc D82; Hs T97)
<i>Bovino</i>	N99	unión actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc G85; Hs N99)
<i>Bovino</i>	V118	unión a actina	Schutt et al. 1993
<i>Bovino</i>	H119	unión a actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc Q105; Hs H119*)
<i>S.cerevisiae</i>	Y120	Parche hidrofóbico-PLP	Thorn et al. 1997en et al. 2000
<i>Bovino</i>	G120	unión actina*	Schlüter K. et.al. 1998; Eads et al.1998 (Sc A106; Hs G120*)
<i>Bovino</i>	G121	unión actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc G107; Hs G121)
<i>Bovino</i>	M122	unión a actina	Shutt et al. 1993
<i>Bovino</i>	N124	unión actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc T110; Hs N124*)
Bovine	K125	unión actina	Schutt et al. 1993; Eads et al.1998 (Sc K111; Hs K125)

<i>Bovino</i>	Y128	unión a actina	Schutt et al. 1993.
<i>Bovino</i>	E129	unión actina	Schutt et al. 1993; Eads et al. (ScK115, Hs E129*)
<i>S.cerevisiae</i>	Y126	Unión-PLP	Wolven et al. 2000; Schlüter et al. 1998
<i>Humano</i>	H133	Unión-PLP	Shchülter Cedergren-Zeppezauer 1994, Thorn et al., 1997
<i>Humano</i>	R136	Unión PIP2	Lambrechts et al. 2002
<i>A thaliana</i>	L139	Parche hidrofóbico-PLP	Thorn et al. 1997
<i>Humano</i>	Y139	unión PLP	Polet et al. 2006

*Aminoácidos en la misma posición para Humano (Hs) y *S.cerevisiae*(Sc), identificados en el artículo de Eads et al.

1.8. Sobre el citoesqueleto de tripanosomátidos.

Comparando con otros organismos eucariontes, una de las características de los protozoarios de la familia *Trypanosomatidae* es la presencia de una malla de microtúbulos por debajo de la membrana plasmática designada como corset subpellicular. Los microtúbulos están involucrados en la división celular, transporte intracelular, movimiento de cilios por flagelos y un papel importante en la organización de la morfología celular. En las secuencias del genoma de los tres tripanosomátidos se pueden identificar componentes homólogos tanto para citoesqueleto basado en tubulina como el de actina (figura 9).

El análisis de los genomas de los tripanosomátidos revela que, en comparación a los eucariontes superiores, estos organismos presentan un grupo de proteínas de unión actina que a pesar de ser limitado, es suficiente teóricamente para llevar a cabo el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina (De Melo et al. 2006). Los tres organismos: *Leishmania*, *T. cruzi* y *T. brucei* (Tabla II) contienen genes que presentan homología para profilina, factor despolimerizante de actina (ADF)/cofilina, twinfilina y la proteína asociada a ciclasa (CAP)/Srv. Están presentes dos tipos de proteínas involucradas en la nucleación de actina (forminas y ARP2/3). Sin embargo, no hay activadores del complejo ARP2/3 (WASP y WAVE), ni homólogos para el complejo de dinactina lo que ha sugerido una pérdida de la habilidad de comunicación entre el sistema filamentoso de actina y el de tubulina (Berriman et al. 2005). Cabe señalar que *T. cruzi* a diferencia de *T. brucei* y *Leishmania major*, ha retenido el complejo CapZ F-actina, lo que sugiere una diferencia en función entre las diferentes especies de tripanosomátidos.



Figura 9. *Sistema de actina y proteínas de unión actina en Trypanosomátidos*. Filamentos compuestos por monómeros de actina se muestra en amarillo. El texto en negro significa los procesos involucrados en la organización del citoesqueleto. Componentes para los cuales los genomas de tripanosomas codifican uno o más homólogos se muestra en rojo y para los que no se encuentran en los tres genomas se indica en texto gris. Las proteínas del CapZ únicamente se encuentran en *T. cruzi* en texto azul. Modificado de Science 2005,5733(309) Cortesía de Yayoi (tesis de maestría)

Tabla II. Identificación de homólogos para proteínas de unión actina en el proyecto de genoma de los tres tripanosomátidos (homólogos detectados ✓ y no detectados ✕)

PROTEINAS DE UNION ACTINA	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>	<i>L. major</i>
Unión a G-actina			
Profilina	✓	✓	✓
Twinfilina	✓	✓	✓
CAP/Srv2p	✓	✓	✓
Timosina β4	✕	✕	✕
Corte			
Gelsolina	✕	✕	✕
Recambio			
ADF/cofilina	✓	✓	✓
Activadores de ARP2/3			
WASP/Scar	✕	✕	✕
Las17p	✕	✕	✕
EPS15/Pan 1p	✕	✕	✕
Verprolina	✕	✕	✕
ABP1	✕	✕	✕
ActA	✕	✕	✕
Nucleación			
ARP2/3	✓	✓	✓
Forminas	✓	✓	✓
Capping			
CAPZ-α+CapZ-β	✓	✕	✕

Existen pocos estudios bioquímicos con respecto a la localización y función de actina en estas especies. En numerosos estudios ultraestructurales de diferentes tripanosomátidos no se han descrito los típicos microfilamentos de actina de 5-7 nm, lo que sugiere que actina no tiene un papel estructural importante en estos organismos (Gull, 1999; Mortara; 1989, De Melo; 2008). Además no se ha descrito motilidad basada en actina en esta familia, ya que estos parásitos no forman pseudópodos ni presentan movimiento por deslizamiento como el visto en los apicomplexa. Tampoco parece intervenir en los procesos de adhesión y citocinesis (Berriman et al., 2005).

Un estudio reciente de inmuno microscopía (tanto de luz como electrónica) en *Leishmania* con anticuerpos homólogos demostró que la proteína no solo se encuentra en el flagelo, núcleo y cinetoplasto sino que también esta

localizada en las membranas nucleares, vacuolares y plasmáticas. La actina asociada a membrana también se observa asociada con los microtúbulos subpeliculares (Saharasrabuddhe et al., 2004). García-Salcedo et al. (2004) empezaron a esclarecer la estructura y localización intracelular de actina en los tripanosomátidos africanos (*T. brucei*). En este estudio se empleó la degradación específica de mensajeros de actina inducida con RNA de interferencia en los dos estadios de *T. brucei*. En las formas sanguíneas, la ausencia de actina resultó ser letal. En este estadio, actina co-localizó con el sistema endocítico, se vieron alteraciones morfológicas y funcionales, como la inhibición de la endocitosis. En cambio, en las formas procíclicas, actina se encontró uniformemente distribuida a lo largo de la célula y no pareció tener una importancia morfológica y funcional (Shi et al. 2000, García-Salcedo 2004). Estos datos sugieren que existen distintos papeles de actina en los diferentes estadios de *T. brucei* (García-Salcedo 2004). La única información que sugiere el papel funcional de actina en el tripanosoma americano *T. cruzi* proviene de Bogitsh y col. 1995, quienes encontraron que el inhibidor de microfilamentos citocalasina B disminuye la entrada de peroxidasa y de sacarosa, así como del número de reservosomas en epimastigotes.

Nuestro grupo de trabajo ha estado interesado en el sistema molecular de actina de *T. cruzi*. Hemos descrito la organización génica de actina y estudiado la regulación de sus RNA mensajeros durante el crecimiento (Cevallos et al. 2003 y Cevallos et al. 2005). En el último estudio se observó que la vida media de mensajeros que codifican para algunas proteínas de mantenimiento como actina, la proteína ribosomal S4, Tripanotión reductasa y TIM se estabilizan durante la fase estacionaria. Recientemente se ha localizado actina en los diferentes estadios de este parásito utilizando anticuerpos contra actina recombinante de *T. cruzi*. En los tres estadios actina presentó una distribución difusa a través de todo el cuerpo celular y el flagelo, sin embargo, en epimastigotes y amastigotes se observaron concentraciones específicas en el bolsillo flagelar (Segura Y., 2008). Dado que no se observaron estructuras

filamentosas, y se demostró que actina se encuentra principalmente en un estado soluble, se sugiere que sus funciones podría llevarlas a cabo a través de la formación de estructuras filamentosas simples, o estructuras transitorias muy inestables. Esto podría ser determinado por las características intrínsecas de la proteína o por las proteínas de unión de actina presentes en el parásito.

1.8.1. Profilina en tripanosomátidos.

El único estudio de profilina en tripanosomátidos fue realizado en *Trypanosoma brucei* en donde se describe que el gen de profilina tiene un marco de lectura abierta de 450 pb, y no se detectaron diferencia de expresión a nivel de mensajero en ambas formas del parásito sanguínea y procíclica (Wilson y Seebeck, 1997). Antes de la publicación del proyecto genoma, el trabajo del grupo de Seebeck resalta que en la secuencia deducida de aminoácidos de profilina de *T. brucei*, presenta una inserción de secuencia inusual de 19 residuos localizada estructuralmente antes de la α -hélice del carboxilo terminal. Sin embargo, no hay estudios sobre su expresión a nivel de proteína ni de su posible función.

El objetivo del presente trabajo fue la caracterización del contexto genómico, análisis de la expresión a nivel de mensajero y análisis de la secuencia deducida de aminoácidos y estructura de la proteína para entender el papel biológico de profilina en *T. cruzi*.

2. OBJETIVO

Iniciar el estudio de profilina en *T. cruzi* mediante la caracterización de su contexto genómico, el análisis de su expresión a nivel de mensajero, análisis de la secuencia deducida de aminoácidos, desarrollo de un modelo estructural y obtención de una proteína recombinante.

2.1. Objetivos particulares:

1. Aislar y secuenciar clonas genómicas que contengan el gen para profilina y estudiar su contexto genómico.
2. Determinar la presencia del transcrito del gen de profilina en epimastigotes y la estabilidad relativa del transcrito en fase media logarítmica y estacionaria del crecimiento.
3. Obtener clonas de cDNA para el análisis comparativas de secuencias con la clona genómica y determinar los sitios de procesamiento del RNAm.
4. Subclonar profilina en un vector de expresión para crear una proteína recombinante.
5. Analizar de la secuencia deducida de aminoácidos para buscar la presencia de motivos conservados reportados en la familia de profilinas.
6. Predecir la estructura terciaria de profilina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de *T. cruzi*.

3.1.1 Cultivos celulares.

Se realizaron cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL Brener (TINF/BR/1963/CL-Brener). Los epimastigotes se cultivaron a 28 °C en medio LIT (liver infusión triptone medium) complementado con suero bovino fetal inactivado al 10%, Penicilina 100 U/ml, Estreptomina 100 µg/ml y Hemina 10 mg/ml. El cultivo siempre se inició a 1×10^6 células/ml. El crecimiento de *T. cruzi* se monitoreó diariamente mediante la cuenta celular en la cámara de Neubauer considerando que el tiempo de generación promedio es de 24 h. En nuestro sistema experimental definimos la fase media logarítmica como el punto en que el cultivo se encuentra a $8-10 \times 10^6$ células/ml de densidad mientras que la fase estacionaria es cuando al hacer la cuenta diaria del cultivo, no se registra un aumento en su densidad por 72 h (aproximadamente $80-100 \times 10^6$ células/ml).

3.1.2. Extracción de DNA genómico.

Cultivo de parásitos de fase logarítmica tardía (30×10^6 cel/ml) con 10^9 células fueron cosechados por centrifugación a 4500 xg durante 10 min/4°C en el rotor SS-34 Sorvall. Posteriormente las células se lavaron en PBS 1X y se resuspendieron en buffer de lisis [Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 50mM, EDTA 50mM (pH 9.0), Tritón X-100 4%] con proteinasa K, y se incubaron a 37°C toda la noche. La extracción de ácidos nucleicos se realizó primero con fenol (pre-equilibrado con Tris-HCl 0.1 M pH 8.0), la segunda extracción fenol:cloroformo 1:1 y finalmente con un volumen de cloroformo. El ADN genómico se precipitó con $MgCl_2$ y se resuspendió en Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 0.2mM, y el RNA

presente fue digerido con RNAasa pancreática (20 µg/ml) por 1h a 37 °C (Medina-Acosta y Cross, 1993).

3.1.3. Extracción de RNA total con Trizol.

Todo material empleado para el manejo de RNA se lavó en agua tratada con DEPC y la cristalería horneada toda la noche. Las cámaras de electroforesis usadas son sólo para RNA y se lavaron también con agua DEPC. Lo anterior se hizo para evitar en lo posible la degradación del RNA. Para todos los experimentos se extrajo el RNA con TRIZOL de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, los parásitos se cosecharon centrifugándolos a 2200 x g por 8 min en centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra 21R. El botón celular se lavó con PBS 1X frío, se transfirieron a un tubo eppendorf. Se centrifugaron de nuevo a 12000 x g/1 min y se eliminó el sobrenadante. Se agregó un mililitro de TRIZOL y se homogenizaron las células pipeteando varias veces. Después de incubarse a temperatura ambiente 5 min se adicionó 0.2 ml de cloroformo. Los tubos se agitaron vigorosamente por ~15 seg. se incubaron a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Las muestras se centrifugaron en frío por 15 min a 12000 x g. Se recuperó la fase acuosa y el RNA se precipitó adicionando 0.5 ml de isopropanol. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó en frío a 7500 x g /10min. El sobrenadante se desechó por decantación. La pastilla formada por el RNA precipitado se resuspendió en un volumen apropiado de agua tratada DEPC.

3.2 Obtención de una sonda de DNA específica para profilina.

Antes de la liberación del proyecto genoma de *T. cruzi* se había identificado en la base de datos de NCBI una clona de la biblioteca de expresión que contiene una secuencia parcial de cDNA de profilina. A partir de la región codificadora incompleta de profilina de *T. cruzi* (código de acceso de AI034988

TENGO048) se diseñaron dos oligonucleótidos. El oligonucleótido con sentido se inicia a partir del nucleótido 3 del marco de lectura abierta (O-profil-f: 5'GTCGTGGCAGGCGTATATATCGATG3') y el antisentido se ancla en la región codificadora aproximadamente 354 nucleótidos después del ATG de inicio (O-profil-r: 5'CGCGCGAAGACATGAAGAAGTTCC3'). Las condiciones de PCR para estos primers fueron 30 ciclos; 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 68 °C por 30 s. Para la amplificación se utilizó el DNA genómico de *T. cruzi* digerido con EcoRI. El producto de PCR de 349 pb se clonó en el vector de PCR Blunt II Topo. Posteriormente se verificó por secuencia que el segmento amplificado contiene la secuencia codificadora para profilina.

Tabla III. Vectores de clonación utilizados en este trabajo.

Nombre	Tamaño	Uso	Proveedor
pBluescript SK-	2958bp	Clonación. Plásmido procedente de pUC19, contiene el origen de replicación de pMB1, de control relajado y considerado un plásmido de alto número de copias. Confiere resistencia a ampicilina	Stratagene
PCR-BluntII-TOPO	3519pb	Clonación de productos de PCR. Vector linearizado con DNA topoisomerasa I del virus <i>Vaccínea</i> , covalentemente unida en su extremo 3' de cada cadena DNA. El vector contiene el gen <i>ccdB</i> , fenotipo letal, fusionado al extremo carboxilo del fragmento LacZ. Los productos de PCR en el vector inhiben la expresión del gen fusionado <i>LacZα-ccdB</i> permitiendo el crecimiento únicamente de las recombinantes positivas después de la transformación y seleccionadas por la resistencia a kanamicina	Invitrogen
pQE-30	3416pb	Expresión de proteína fusionada a seis histidinas en el extremo 5' del polylinker. Contiene elementos que regulan su expresión como promotor T5 y dos secuencias operadoras donde se une el represor <i>lac</i> . Dos fuertes terminadores transcripcionales y un gen para β -lactamasa (<i>bla</i>) que confiere resistencia a ampicilina.	Qiagen

3.3. Preparación de sonda con marca radioactiva.

Las sondas empleadas en estudios de Southern y Northern blots de nylon se elaboraron con el kit de marcaje "Random primers labeling system" (Invitrogen). Brevemente se empleó 25 ng de DNA blanco desnaturalizado por calor (temperatura de ebullición del H₂O/10min.) en 25 µl de agua y se adicionó 5 µCi [α^{32} P] dCTP (sp.act. 3000 Ci/mmol). La sonda se liberó de marca libre al pasarla por una columna de Sephadex G-50. Finalmente se agregó a 10 ml de solución de hibridación (50%Formamida, 4X Denhardts, 0.2% SDS, 120 mM buffer de fosfatos, SSC 2X, 2 mM EDTA pH 8). Antes de su uso la sonda se calentó a temperatura de ebullición del agua por 5 minutos en baño maría.

Todas las hibridaciones se hicieron a 42 °C por 18 h. Las membranas para Southern blot se lavaron en una solución de SSC 0.2X y SDS 0.1%, y para Northern Blot SSC 2X y SDS 0.2%; a 42 °C durante 30 minutos, 3 veces.

3.4. Caracterizaciones génicas.

3.4.1 Experimento tipo Southern Blot.

El DNA genómico obtenido de epimastigotes de *T. cruzi* (7 µg por carril) o el DNA plasmídico (0.3 µg por carril) fueron digeridos con endonucleasas de restricción y los fragmentos de DNA resultantes se separaron por electroforesis en un gel horizontal de agarosa 0.8% en 1X TBE. Las bandas de DNA fueron visualizadas después de teñir el gel con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta. El gel se enjuagó con agua desionizada y se colocó en solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) en agitación durante 50 min a temperatura ambiente. Pasado esto el gel se enjuagó y se colocó durante 50 min en agitación en solución neutralizante (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5M pH 7.2, EDTA 0.1 mM). Posteriormente el DNA de los geles fueron transferidos de acuerdo al método descrito por Southern (Southern,

1974) a una membrana de nylon (Hybond-N, Pharmacia Biotech Limited), posteriormente se fijó por radiación UV utilizando un Hoefer UV cross-linker (Hoefer Scientific Instruments) y se bloqueó la membrana con solución de hibridación (Formamida 50%, Denhardtts 4X, SDS 0.2%, buffer de fosfatos 120 mM, SSC 2X, 2 mM EDTA pH 8) a 42 °C/2h. Las membranas fueron hibridados con la sonda marcada radiactivamente diluida en solución de hibridación a 42°C/18h. Después de este tiempo se retiró la sonda marcada al lavarse por tres tiempos, la membrana se expuso a una pantalla (FUJI) y la imagen resultante es capturada y digitalizada después de 24h de exposición con el sistema Molecular Imagen (BioRad Laboratorios). El tamaño de los fragmentos de digestión fue estimado en base a los marcadores Ladder 1kb Invitrogen.

3.4.2. Electroforesis de Campos Alternos Transversales (TAFE) (Schwartz et al. 1984).

Los cromosomas se obtuvieron del cultivo de epimastigotes (aprox. 2×10^9 células) el cual fue centrifugado a 6000 x g durante 10 min a 4 °C. El botón se enjuagó con PBS 1X, las células intactas obtenidas fueron resuspendidas en 2 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1% fundido en TBE 1X. Se realizaron bloques de agarosa con epimastigotes al vaciar sobre un molde, se dejaron solidificar 15 min a 4°C, posteriormente se colocaron en la solución de lisis (Sarcosil 1%, EDTA 0.5 M pH 8.0 y proteinasa K 1mg/ml) y se incubaron a 50°C en la solución de lisis durante 48 horas, con el fin de liberar los cromosomas intactos. Una vez transcurrido este tiempo los bloques de agarosa se enjuagaron con TE dos veces y se almacenaron a 4°C hasta ser utilizados. Posteriormente dos terceras partes (aproximadamente 1.3×10^8 parásitos) de un bloque se utilizó para correr en el sistema TAFE, dentro de un gel de agarosa 1% en TBE 0.5 X (45.5 mM Tris, 45.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8). El gel se corrió a 14 °C en el equipo de campos alternos transversal (Gene-Line System, Beckman) a 280 V por 80 h con pulsos de 3 min, seguido por 40 horas a 400 V con pulsos de 8 min (Riveron et al. 1994). Al término de la corrida el

gel fue depurinizado en 200 ml de HCl 0.2 M con dos cambios de 15 min. Posteriormente se enjuagó con agua desionizada y se colocó en solución desnaturante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) en agitación durante 50 min. De nuevo se enjuagó y se colocó durante 50 min en agitación con solución neutralizante (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5M pH 7.2, EDTA 0.1 mM). Posteriormente el DNA de los geles fue transferido de acuerdo al método descrito por Southern (Southern, 1974) a una membrana de nylon (Hybond-N, Pharmacia Biotech Limited) e hibridado con la sonda radiactiva 42°C/18h. Como control de tamaño se utilizaron marcadores DNA de levadura-PFGE.

3.4.3 Tamizaje a partir de una Biblioteca Genómica y Biblioteca de cDNA de *T. cruzi*.

Se utilizó una biblioteca genómica-*EcoRI* (*T. cruzi* II cepa CL-Brener) y una biblioteca de cDNA de TINF/CL/1945/cepa Tulahuen-*EcoRI-KpnI* (*T. cruzi* I) construidas en el vector λ ZAP II (Stratagene). Ambas bibliotecas se tamizaron por tres rondas utilizando como sonda el fragmento de DNA de profilina (355pb) obtenido a partir de la base de datos ESTs de *T. cruzi*. La escisión del fagémido a vector pBlueScript SK- se realizó de acuerdo a las instrucciones propuestas por el fabricante (Stratagene). Las clonas obtenidas fueron secuenciadas por el método dye-terminator dentro del secuenciador automatizado ABI-PRISM™ 310 (Applied Biosystems).

3.4. Caracterización del RNAm.

3.5.1. Northern blot.

El gel se preparó fundiendo la agarosa en 73 ml de agua tratada con DEPC en horno de microondas, se dejó enfriar lo suficiente para poder agregar 10 ml de buffer MOPS / EDTA 10X y 16.2 ml de Formaldehído 37%, se agitó suavemente para homogenizar y se vació en cámara de electroforesis (Pellé et

al. 1993). Se dejó gelificar por 1 h. Se empleó MOPS / EDTA 1x como buffer de corrida. El gel se pre-corrió a 60 V por 3 min y una vez cargadas las muestras el gel se corrieron a 80 V/4.5h. Posteriormente el RNA del gel desnaturizante fue transferido a una membrana de nylon (Hybond-N, Pharmacia Biotech Limited) la cual se fijó, se bloqueo e hibridó con la sonda radiactiva. El control de tamaño de los fragmentos hibridados fueron estimados a partir de marcadores de RNA 0.24-9.5 kb, Invitrogen.

3.5.2. Determinación de la vida media de RNAm

Al cultivo de epimastigotes en dos puntos, fase estacionaria y fase logarítmica, se adicionó actinomicina D suficiente para una concentración final de 10 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$. Inmediatamente antes de agregar el fármaco se tomó la alícuota para el tiempo 0. El resto del cultivo se incubó a 28°C y se toman alícuotas a diferentes tiempos, en nuestro caso: 1, 3, 6, 9, 12, 24 y 36 h (Cevallos et al., 2003). Estas muestras se lavaron una vez en PBS 1X frío, los epimastigotes fueron cosechados por centrifugación y los pellets finales se guardaron a -70 °C. Al finalizar el experimento se realizaron extracciones de RNA con TRIZOL (Invitrogen).

3.5.3. Determinación de niveles de equilibrio de RNAm.

Del volumen total de RNA purificado se corrió una muestra de 2 μl en un gel de agarosa 0.8% para ver la integridad y cantidad relativa del mismo. Cuando se comprobó que el RNA estaba integro, se precipitó aproximadamente 10 μg de RNA con 1/10 de volumen de acetato de potasio 3 M y 2.5 volúmenes de Etanol 100 % a -20°C toda la noche. Se centrifugó por 15 minutos a máxima velocidad en centrífuga eppendorf modelo 3415 D, el sobrenadante se desechó por decantación y la pastilla se resuspendió en el buffer especial para northern (agua DEPC, buffer A, formaldehído-formamida 3:7 y colorantes para GLB).

Antes de realizar el gel para hacer el Northern blot, se realizó un gel preparativo para normalizar la carga entre las diferentes muestras en tiempos (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 y 36 h) tomando 2 μ l de cada muestra para analizarlos en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Con el Molecular Imager FX system se determinó por densitometría la abundancia relativa de RNA, se utilizó como control de carga las 3 especies mayores de RNA ribosomal que son muy abundantes y fácilmente visibles. Una vez calculado la carga de las muestras se realizó el gel para northern e hibridación del blot (ver northern Blot). La cantidad de la señal radioactiva en la membrana fue detectada con el sistema Molecular Imager FX (BioRad) y la cuantificación de las muestras fue hecho utilizando el software Quantity One (BioRad). Los niveles específicos de RNAs fueron normalizados en relación a la cantidad de RNAr 24S- β presente en cada línea detectada por hibridación (Cevallos et al. 2003). La cantidad de marca presente a cada tiempo se ajustó por carga y los resultados se expresaron como la relación de RNAm de profilina/24S β RNAr, normalizado al 100%.

3.6. Proteína recombinante.

3.6.1. Subclonación del gen de profilina de *T. cruzi*.

La construcción de una proteína recombinante se inició con la subclonación de la región codificadora completa de profilina y un péptido recombinantes en el vector de PCR Blunt II Topo. Para ello se realizaron reacciones de PCR (30 ciclos; 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 70 °C por 3 min) con un par de oligonucleótidos para cada construcción, donde el templado fue la clona genómica (ver tabla III). Los oligonucleótidos diseñados contienen el sitio de restricción *Bam*HI (subrayado) y mantienen el marco de lectura abierta en fase con seis histidinas del vector recombinante pQE-30 dentro del extremo amino de la proteína ó péptido de interés.

Tabla IV. Oligonucleótidos empleados para la subclonación de la proteína y el péptido recombinantes. En negritas se resalta el codón de inicio y término de la proteína.

	Foward	Reverse
REC1	<u>ggatcc</u> atg tcg tgg cag gcg	<u>ggatcc</u> tta gta atc taa act gat aag
REC2	<u>ggatcc</u> ctc gtg cag tcc tcc	<u>ggatcc</u> tta tgc aat aat agc cgt ctg

Los insertos recombinantes se subclonaron con el sitio *Bam* HI en vectores de expresión pQE-30. Las construcciones resultantes se utilizaron para transformar *Escherichia coli* cepa M15, que contiene el plásmido pREP4. Éste se mantiene en presencia de kanamicina y confiere mayor control de la expresión de la proteína/péptidos recombinantes (QIAexpress, QIAGEN), la selección de las clonas resulta de la resistencia a ampicilina/kanamicina. Todas las construcciones obtenidas se confirmaron por secuencia.

3.6.2. Expresión de la proteína recombinante.

E.coli M15 transformada con cada una de las construcciones de expresión obtenidas fueron cultivadas en medio con ampicilina (100µg/ml) y kanamicina (25µg/ml) a 37°C toda la noche (QIAexpress, QIAGEN). A partir de éste se sembró un cultivo nuevo con los dos antibióticos, hasta una densidad óptica de 0.6 (absorbancia a 600nm). Llegada a esta densidad se tomó 1 ml del cultivo para el tiempo cero de inducción y posteriormente se indujo de acuerdo a las indicaciones del Kit QIAexpress adicionando isopropylthio-β galactoside a una concentración final de 1 mM y 0.1 mM. Se dejó incubando 37 °C/5 h colectando 1 ml del cultivo inducido cada hora. Posteriormente las alícuotas se centrifugaron a 12,000xg / 20 min a 4 °C. Al retirar el sobrenadante los botones celulares se congelaron a -20 °C.

3.6.3. Electroforesis de proteínas e Inmunohistoquímica.

El botón de células congelado se disolvió en tampón de carga en condiciones reductoras (62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 25% de glicerol, 2% de SDS 10%, Glicerol, 0.01% azul de bromofenol y 0.1%, β -mercaptoetanol), se calentó a 92 °C 5min. Se dejó en hielo mientras se carga en el gel. Dos geles de separación de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12% se prepararon a temperatura ambiente conteniendo 0.1% de SDS, como previamente fue descrito (Laemmli, 1970). Las condiciones de corrida fueron tampón Tris-Glicina (25mM Tris pH8.8, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS) a 20 mA durante 1.5 h. Uno de los dos geles corridos en paralelo se tiñó (azul de coomasie 1X Bio-rad), se destiñó (20% de etanol y 10% ácido acético glacial), los tamaños de las proteínas se verificaron con marcadores totales de peso molecular SDS-PAGE (Broad range BioRad). El segundo gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa 0.45 μ m (Laboratorios BioRad, California, US) en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.19 M glicina y 20% metanol) por 2 h a 150 mA (Towbin et.al, 1979).

Posteriormente, para detectar la proteína recombinante expresada con un tallo de histidinas, se llevó a cabo el reconocimiento de la bandera con el anticuerpo comercial anti-histidinas (0.2 μ g/ml Anti-His₆ mouse IgG, ROCHE). El segundo anticuerpo reconoce IgG (0.2 μ g/ml Anti-mouse IgG, AP-labeled Pelkin-Elmer) y como control positivo se utilizó un standard de peso molecular que contiene 6Xhis (6X Ladder, Qiagen). Durante el procedimiento la membrana se lavó con PBS/0.1%Tween20 a temperatura ambiente. Después del lavado la reacción se reveló con un sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato a una concentración 0.21g/l y nitroazul de tetrazolio a una concentración 0.42 g/l) para la fosfatasa alcalina y se dejó actuar hasta que se hicieron visibles las bandas. La reacción se paró al retirar el sustrato y cambiar a agua destilada.

3.7. Modelaje molecular.

La predicción de la estructura terciaria a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de profilina en *T. cruzi* se realizó con el programa MODELLER (<http://salilab.org/modeller/>), que utiliza la base de datos de proteínas con estructura cristalográfica determinadas experimentalmente (PDBs). El programa se llevó a cabo por cuatro pasos (Sali et al., 1993):

- A. La identificación y selección de secuencias homólogas que tengan el mayor grado de similitud con la proteína a ser modelada y de las cuales se conozcan las estructuras cristalográficas (templados).
- B. Alineamiento de la secuencia a ser modelada con la secuencia templado con mejor resolución cristalográfica.
- C. Construcción de un modelo de la estructura terciaria
- D. Validación del modelo resultante.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de una sonda homóloga para profilina.

Este proyecto se inició antes de la publicación de la secuencia del genoma de *T. cruzi*, por lo que primero se buscó y encontró accesado, en la base de datos para Secuencias de Expresión (ESTs) de *T. cruzi*, un gen homólogo incompleto a profilina (AI034988 TENG18 *T. cruzi*). Con esta secuencia se diseñaron los oligonucleótidos O-profil-f con sentido y el anti-sentido O-profil-r (figura 10) y a partir de DNA genómico se amplificó un producto del tamaño esperado de 349 pb correspondiente a los nucleótidos 3 a 351 de la región codificadora de profilina. El producto de amplificación se clonó en el vector plasmídico PCR-Blunt II-TOPO (vector diseñado para clonar productos de PCR), y la identidad del inserto fue confirmada por secuencia. Este fragmento fue usado como sonda molecular en los estudios de hibridación que se describen a continuación.

```
GTTTCTGTA CTATATTG GAAATATGGGATAT TAAAAAAGGAAATTCGAACTTTTAA ATGT
O-profil-F
CGTGGCAGGCGTATATCGATGACAGCCTTATCGGCAGTGGACACATGCACAGTGCGGCGA
TTGTTGGTCTTTCCGACGGGAGTTACTGGGGTTATGGAGGAACCTATATCCCACAGCCTG
ATGAGGTTGCCCATATATTGAAGTGCCTGGGAAATTTTTCACTCGTGCATTCTCCGGCG
TGACTATCTATGGTGTGAAGTTTTTTGGTCTTCCCTCTGGTGAACAAGGCGAAATGAAAT
ACCTCTTTTTTCAAAAAAGGTGCGGCGGGTGGATGCATCTATACATCAAAAACAGACGGCTA
O-profil-R
CTACTGCAGTTTACGGGAATCCCGAACTTCTTCATGTCTTCGCGCGATCTTGAAAAGAA
AGAGGGAGCCTAAATTGCACCCC
```

Figura 10. **Secuencia de cDNA de profilina.** En la caja se indica una parte del miniexón (o Spliced-leader), el subrayado denota el par de oligonucleótidos utilizados y el codón de inicio en negritas (accesada AI034988).

4.2. Caracterización genómica.

La hibridación de los cromosomas de *T. cruzi* separados por TAFE con la sonda de profilina identifica dos bandas de 1.25 Mb y 2 Mb, lo que sugiere la presencia de dos locus para profilina o la presencia de un solo locus dentro de dos cromosomas homólogos de tamaño diferente (figura 11 A). Para determinar cual es la situación más probable, el DNA genómico se digirió con enzimas de restricción sencillas *EcoRI*, *PstI* y *ClaI*. Estudios de Southern Blot demostraron la presencia de una sola banda en las digestiones de *PstI* (8 kb) y *ClaI* (1.2 kb) y de dos bandas de 7.2 y 3.1 kb en el DNA digerido con *EcoRI* (figura 11 B). Para esclarecer esta situación se decidió clonar y secuenciar ambos fragmentos obtenidos con la digestión de la enzima *EcoRI*.

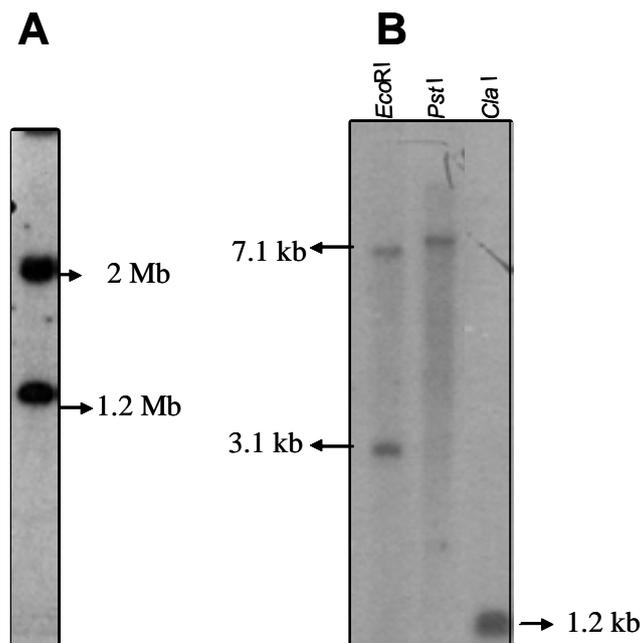


Figura 11. **Identificación y localización de regiones codificadoras para profilina en cromosomas de *T. cruzi* y en fragmentos de restricción.** Blot de cromosomas, panel (A) y Southern blot de DNA genómico de digerido con enzimas de restricción *EcoRI*, *PstI* y *ClaI*, panel (B). Se utilizaron marcadores DNA levadura-PFGE Invitrogen (A) y Ladder 1 kb Invitrogen (B).

4.3. Obtención de una clona que contiene el gen de profilina.

Para aislar y caracterizar los fragmentos genómicos *Eco* RI que contienen las regiones codificadoras de profilina, se tamizó una biblioteca genómica de *T. cruzi* (construida en lambda ZAPII utilizando el sitio de restricción *Eco* RI y realizada por la Dra. Imelda López) utilizando como sonda el fragmento clonado de DNA PPROF-349 pb. De esta búsqueda se aisló una sola clona de la cual se escindió como plásmido pBluescript II y se caracterizó el inserto de aproximadamente 7.2 kb, que corresponde al tamaño de uno de los dos fragmentos con *Eco*RI hibridados en el Southern blot (figura 11 panel B). Se intentó clonar el segundo fragmento de 3.1 Kb, sin éxito. Con el fin de caracterizar la clona genómica obtenida, el contexto génico y mapear la localización del gene de profilina; se realizaron digestiones enzimáticas sencillas y dobles. Los fragmentos se separaron en gel de agarosa 0.8% (figura 12 panel A, izquierdo) y se hibridaron con la sonda radiactiva de PROF-349 nt (figura 12 panel A, derecho).

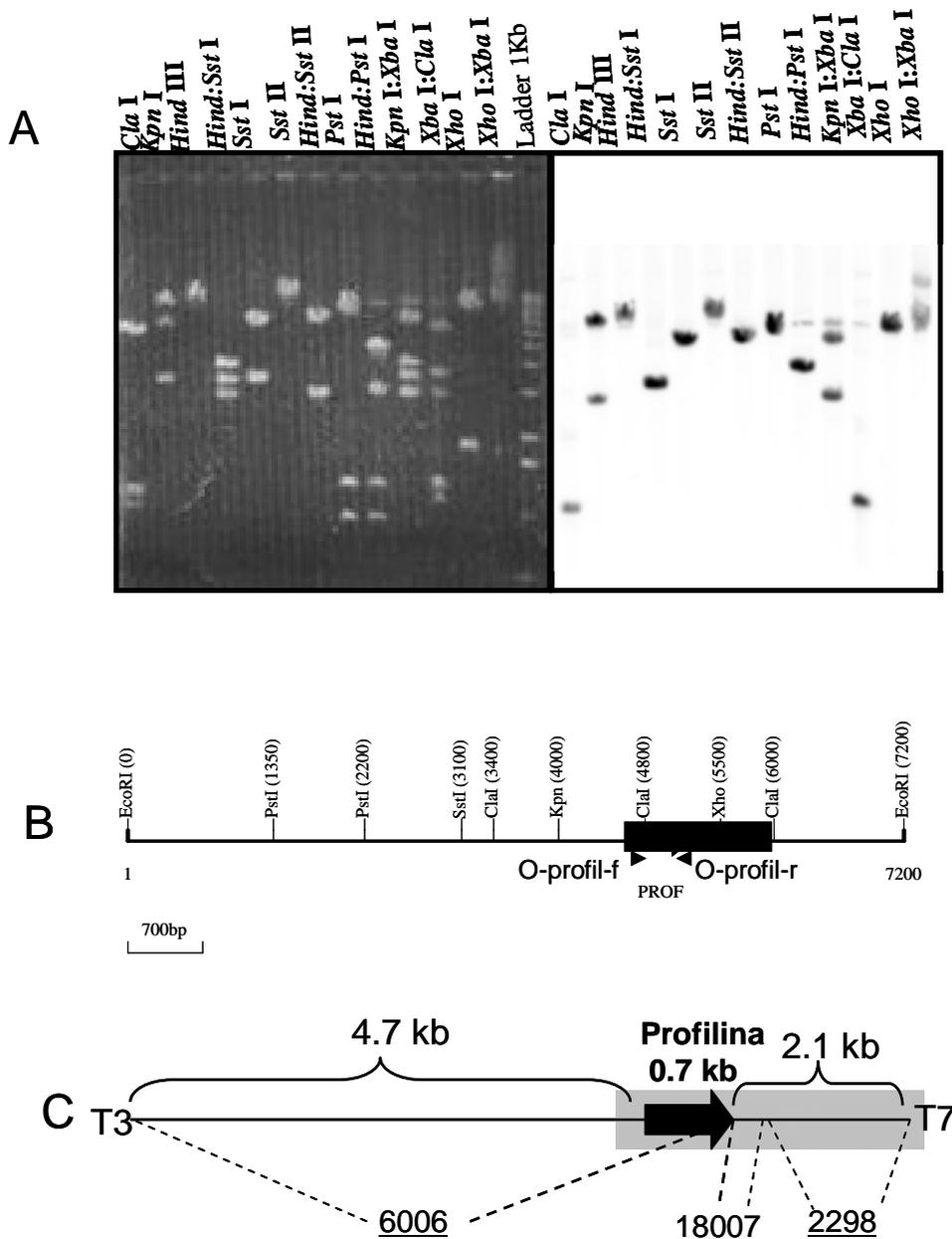


Figura 12. *Mapa de restricción de clona genómica conteniendo la secuencia del gene de profilina.* (A) A la izquierda gel de agarosa que contiene fragmentos de DNA de la clona obtenida y a la derecha Southern Blot hibridado con fragmento de 355pb de profilina, Ladder 1 kb Invitrogen. Panel (B) mapa de restricción enzimática de la clona genómica, se indican con cabeza de flecha la localización de los oligonucleótidos de 20nt con los que se obtuvo la región codificadora completa de profilina y en caja negra la región mínima de hibridación mapeada en base al Southern Blot. Panel (C) indica la región delimitada del gen de profilina y la región que fue secuenciada sombreada en gris. Los números de bajo del esquema corresponden a contigs contenidos en *T. cruzi* GeneDB.

El patrón de digestión e hibridación delimita un fragmento de hibridación de 1.2 kb con *Cla* I, indicado por un rectángulo negro figura 12 B. Esto localiza al gen a $\cong 4.7$ kb del extremo T3 y $\cong 1.2$ kb del extremo T7 del vector, figura 12 B. Cabe resaltar que el fragmento de 1.2 kb del DNA es congruente en tamaño con la banda identificada con *Cla* I del Southern blot, figura 11 B. La clona genómica se secuenció parcialmente utilizando oligonucleótidos O-profil-f y O-profil-r, figura 12 B. Se demostró la presencia de la región codificadora de profilina completa (450 nt) cuyo extremo 3' se localiza a $\cong 2.1$ kb del promotor T7 del vector, figura 12 panel C. Utilizando la secuencia del gen de profilina se realizó una búsqueda por algoritmo BLAST en la base de datos del proyecto genómico de *T. cruzi* y se identificaron dos contigs para profilina accesados. Uno de ellos perteneciente al haplotipo Esmeraldo (3338.t00003) y el otro al No Esmeraldo (6006.t00006). La figura 13 muestra el alineamiento de secuencias de los dos contigs con nuestra secuencia de profilina (PROF). Por comparación de las mismas, se determinó que nuestra clona tiene 100% similitud al haplotipo No Esmeraldo y diferente al haplotipo Esmeraldo en ocho cambios en la secuencia nucleotídica conservados.

Al analizar los contigs accesados, de manera interesante, se identificó que uno de los contigs termina a 260 nt y el otro a 430 nt río abajo del gen de profilina. Como se mencionó anteriormente, nuestra clona genómica delimitada por *EcoRI* (No Esmeraldo) contiene una región de 2.1 kb río debajo de profilina (figura 12 C), no presente en los contigs accesados. Por lo tanto, se decidió secuenciar esta región y buscar las secuencias obtenidas por BLAST en la base de datos del proyecto genoma. Se identificaron tres nuevos contigs: 2298.t0001, 18007 y 8019.t00015. Solo el contig 2298 es designado como haplotipo No Esmeraldo y los dos contigs 18007 y 2298 no tienen haplotipo designado. La secuencia del contig 18007 es idéntica a la secuencia de nuestra clona genómica y se localiza inmediatamente río abajo del gen de profilina (ver figura 14). La secuencia del contig 2298 es 99% similar con nuestra secuencia y se encuentra río debajo de la región correspondiente al contig 18007 (figura 14), por lo que probablemente corresponde al haplotipo No-Esmeraldo. El contig 8019 tiene 98% de similitud con nuestra secuencia y probablemente corresponda a la variante alélica Esmeraldo. Además, se hizo un análisis de las secuencias presentes en estos contigs (el 6006 limitado a la zona correspondiente a nuestra clona genómica), se identificaron los marcos de lectura abierta en ellos contenidos y se ensamblaron en el orden correspondiente figura 14.

Como se puede ver en este esquema se sugiere que el contig 8019 corresponde a la región río abajo de profilina en el alelo Esmeraldo. Para demostrar esta hipótesis, se realizaron ensayos independientes tipo Southern Blot de DNA genómico de *T. cruzi* digerido con *EcoRI*, figura 15. Ambos se hibridaron con dos sondas, la primera con el fragmento de 2.1 kb de la clona genómica (delimitada *XhoI-EcoRI*) y la segunda con sonda del gen de profilina. Del análisis comparativo de los resultados del patrón de hibridación se observa que los contextos génicos están relacionados.

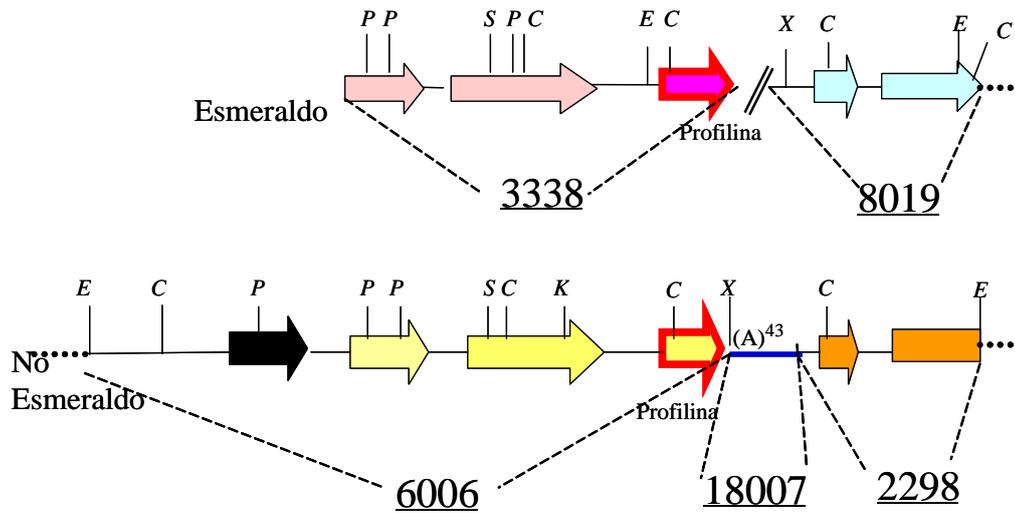


Figura 14. Diagrama del contexto genómico para las dos variantes alélicas de *profilina*. Los contigs correspondientes a este locus fueron ensamblados a partir de la información obtenida con nuestra clona. Por simplicidad los contigs 8019 y 6006 fueron acotados a la región correspondiente a nuestra clona.

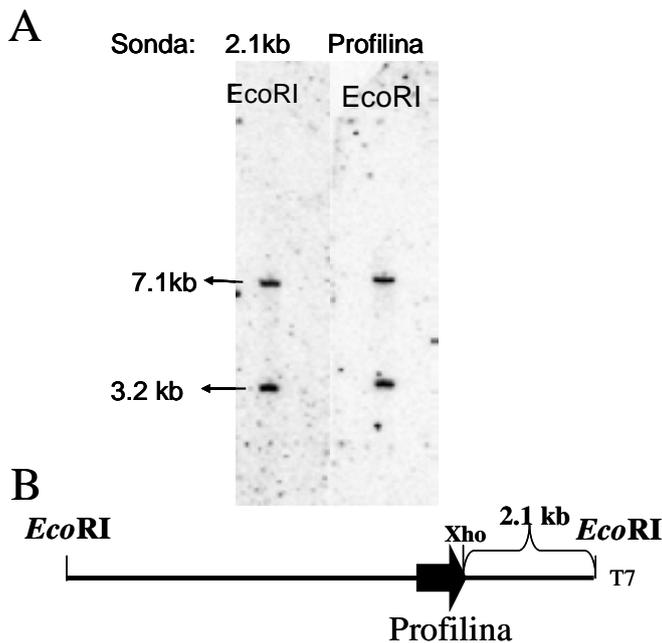


Figura 15. Caracterización de la región 3' de *profilina*. El panel A de la izquierda se híbrida con el fragmento de 2.1 kb de la clona genómica río abajo de *profilina* y el panel de la derecha con la sonda de *profilina*. La representación gráfica y localización en la clona genómica de las sondas utilizadas se muestran en el panel B. Los marcadores moleculares empleados corresponden a Ladder 1 kb Invitrogen.

4.4. Expresión del RNAm.

Para ver si se expresa el gen de profilina, el RNA total fue separado electroforéticamente en condiciones desnaturizantes, transferido a una membrana de nylon y, finalmente, hibridado con la sonda de profilina; recuadro de la figura 16. Se identificó una banda de 0.7 kb de tamaño consistente de un mensajero maduro que codifique para una proteína de 150 aminoácidos en *T. cruzi*. La expresión de los genes, que codifican para proteínas en tripanosomas, requiere el procesamiento del transcrito primario mediante la adición del miniexón en el extremo 5' por trans-splicing y la poliadenilación del extremo 3', para cada generar RNAm maduros. Para identificar estos sitios de procesamiento del RNAm se realizó el tamizaje de una biblioteca de cDNA *T. cruzi* (cepa Tulahuén) obteniendo dos clonas con secuencias de la región codificadora para profilina. Estas secuencias contienen tanto el miniexón como la cola de poli A. El análisis de las secuencias permitió determinar que la longitud de la región 5' no traducida es de 39 nt de longitud. Las dos clonas diferían en el sitio de poliadenilación ocurriendo a 148 y 158 nt río abajo de la señal de termino de traducción. Para identificar las señales que determinan el procesamiento de estos transcritos se comparó la secuencia de estas clonas con la secuencia genómica (figura 16). De esta manera, se identificó, un dinucleótido AG precedido de una región rica en pirimidinas (12 nt) consistente con las señales previamente descritas para el procesamiento. También se pudo identificar que el último nucleótido diferente a A, en donde se insertó la cola de poliA en las clonas de cDNA analizadas en ambos casos es una T.

Northern Blot



```

ACGCCTTTACGCATAAAAGGGAAAAAAGAAC'TTCTTTAGGAATTATTATTATTATTAT
TCATCTGGGTGACTCAAGTATTTGCCGCTAATTTGAAATGATTATCTGAGT'TTTTGGGG
AAAATTGAGCAGCTGCAAATATATTTGCATGCATATTGCACATGTTTCTGATATATGTA
AAATATATAAAATTTATCCATATGCATCCTAAAAAAGAAAGAAAAAGCTCTTTGTT
TTGCTAA'TTTCTTTT'TAAAGGAAATATTGGATATTA'AAAAAGGAAATTCGAAC'TTT
TAAATG region codificadora de Profilina TAAATTTCTTAATTTA
AGGATTATATTTTTACTTCTTATTAGCGGAAACCATATTTTGTCTGTTGTTGTAAGACTT
• ACATCAATATATATATATATATATATATATATATATATATATTTGTGCCTGTT'TTTTCCCTTT
TTTTTTTTTGCATTTT'TGTCTTTCTT'TAGCTT

```

Figura 16. *Expresión de profilina a nivel de mensajero y caracterización de sus sitios de procesamiento.* En el recuadro superior se muestra el RNAm. En la parte inferior se muestra solo la posición de los codones de inicio y termino de la traducción (negritas) de profilina ya que la región codificadora completa no se muestra. En cajas se indica los motivos para el procesamiento: el sitio aceptor del spliced leader (AG) y el tracto de polipirimidinas. Dos sitios de poliadenilación son indicados en negritas, que representa el último nucleótido diferentes a “A” presente en los mensajeros. El tamaño del fragmento hibridado fue estimado a partir de marcadores de RNA 0.24-9.5kb, Invitrogen.

Como parte de la caracterización del RNAm de profilina, se estimó su tiempo de vida media en epimastigotes de dos etapas de crecimiento, para determinar si el mensajero se estabiliza durante la fase estacionaria como sucede con otros genes de mantenimiento. En la curva de crecimiento (figura 17) se indican los puntos considerados como fase media logarítmica (ML) y estacionaria (S), en los que se estudió la dinámica de decaimiento de este mensajero después de la adición del inhibidor transcripcional Actinomicina D (10 µg/ml). La cantidad de mensajero remanente se determinó mediante ensayos

de tipo northern blot en muestras obtenidas a 0, 1, 6, 9, 12 y 24 hrs después de inhibir la transcripción.

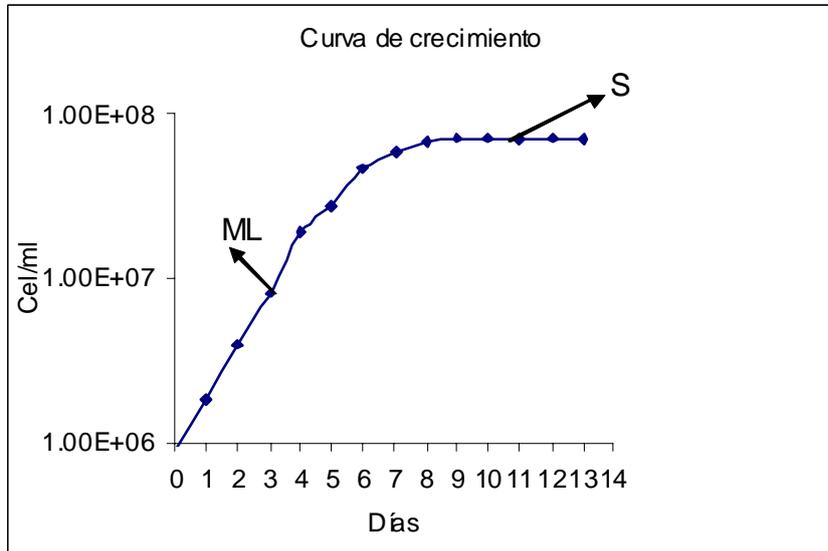


Figura 17. **Curva de crecimiento de epimastigotes.** Las flechas indican el punto de adición de Actinomicina D (10 μ g/ml) tanto en la fase media logarítmica (ML) y la fase estacionaria (S).

En la hibridación, la unión de la sonda fue detectada con el sistema FX de Imager Molecular (BioRad) y la cuantificación de las muestras se realizó por el software Quatity One (BioRad). La cantidad de marca presente a cada tiempo fue ajustada por carga y los resultados se expresan como la relación de profilina/24S β RNAr, normalizado al 100% (ver metodología). Estos datos fueron graficados y utilizados para calcular la vida media del transcrito, mientras que la fase media logarítmica fue de aproximadamente de 3h, y la fase estacionaria se duplicó (6h) (ver figura 18). Esto significa que los mensajeros de profilina se estabilizan durante la fase estacionaria, como ocurre con otro que codifican para proteínas de mantenimiento.

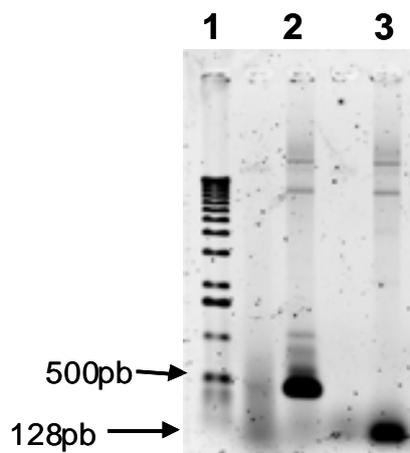


Figura 20. **Productos de la reacción de PCR.** ADN-REC1 que codifica para profilina, 453 pb (carril 2) y el ADN-REC2, 128pb que codifica para los aminoácidos de 56 a 104, (carril 3). Marcadores de tamaño 1Kb, Invitrogen (carril 3)

Las dos construcciones obtenidas fueron verificadas por secuencia, demostrándose que la cola de histidinas se encuentra en el marco de lectura adecuado para su expresión como proteína de fusión (figura 21).

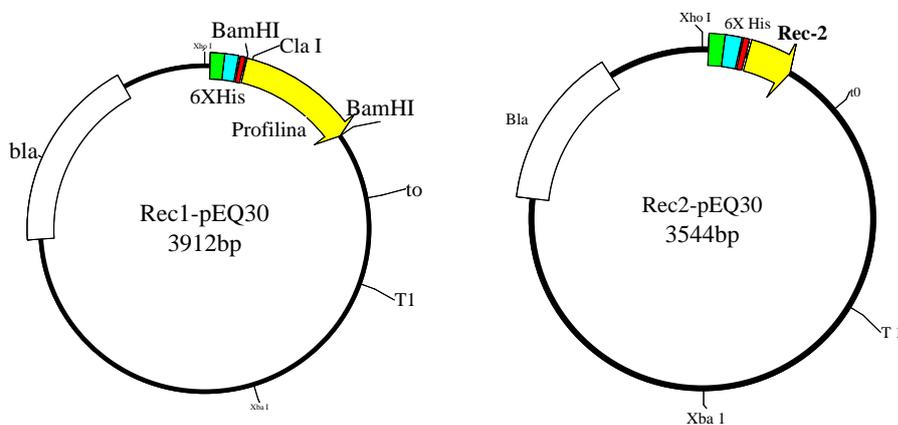


Figura 21. **Representación gráfica de las construcciones Rec1-pQE30 y Rec2-pQE30.** En verde se denota la localización del promotor, el operador lac en azul, la bandera de histidinas en rojo y los genes del péptido o proteína en amarillo.

3.5.1. Cultivos de expresión a menor escala.

Se buscó la expresión de la profilina recombinante de un tamaño esperado 21kDa y del péptido recombinante de un tamaño esperado 6.4 kDa con diferentes concentraciones de IPTG en *E.coli* cepa M15[pREP4]. Las células fueron lisadas en condiciones reductoras y se analizaron en geles SDS-PAGE, donde aparentemente no fue posible identificar la presencia de la proteína y del péptido recombinantes por su tinción del gel con el azul de Coomassie.

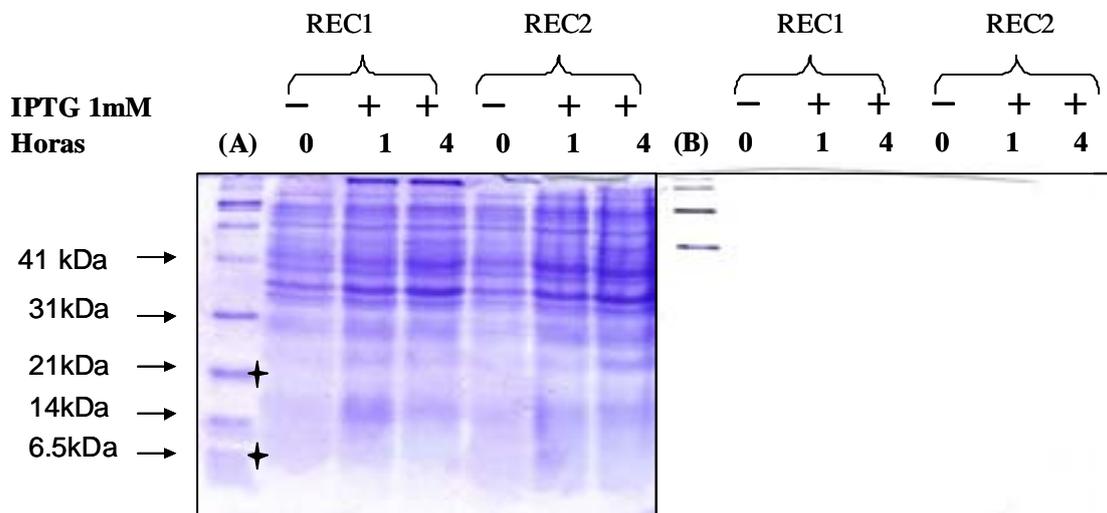


Figura 22. **Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes de *T.cruzi* en *E.coli*.** Lisados totales de cultivo de *E.coli* inducido con IPTG durante 1 y 4 hr, tanto para profilina recombinante (REC1) como el péptido recombinante (REC2). Panel (A) Gel de acrilamida SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie con marcadores de peso molecular (Broad rangeBioRad). Panel (B) corresponde a la inmunohistoquímica con la reactividad del anticuerpo α -His₆ mouse IgG, marcador 6X His-Qiagen. Las estrellas indican donde se esperarían las proteínas recombinantes.

Para determinar si la proteína o el péptido recombinantes se expresaban en cantidades por debajo de la resolución de la tinción empleada, se intentó su detección a través del reconocimiento de su cola de histidinas mediante un anticuerpo comercial anti-histidinas (Anti-His₆ mouse IgG, ROCHE); como control positivo se utilizó un estándar que contiene marcadores de tamaño fusionados a

una cola de 6Xhis (6X Ladder, Qiagen) (figura 22). El revelado de la membrana se realizó por precipitación del sustrato insoluble producido por la fosfatasa alcalina conjugada en el segundo anticuerpo. Debido a que no fue posible visualizar ni la proteína, ni el péptido recombinantes, pero sí el control positivo presente en los marcadores 6Xhis, los resultados son indicativos de que no hubo expresión detectable de proteínas recombinantes. Debido a esto no fue posible generar los anticuerpos policlonales como se había planeado. Se descartó la posibilidad de la falta de expresión fuera secundaria a la inestabilidad plasmídica ya que fue posible rescatar el vector de expresión con profilina.

4.6. Análisis de secuencia y predicción de la estructura terciaria de profilina.

4.6.1. Análisis de la secuencia deducida de aminoácidos.

El análisis comparativo de la secuencia deducida de aminoácidos de profilina de *T. cruzi* con otros tripanosomátidos demostró la presencia de una proteína conservada con un similitud de 84.6% para *T. brucei* y de 75.3% para *L. major*. En los tres organismos se identificó la inserción de diecinueve residuos, previamente identificada en *T. brucei* (figura 23) (Wilson y Seebeck, 1997). Como era de esperarse, el grado de similitud con otros organismos incluso entre protozoarios es menor, siendo del 61% con *Acanthamoeba castellanii*, 26% con *Dictyostelium discoideum* y de 20% con *Tetrahimena termophila*. La profilina de *T. termophila* contiene dos inserciones; la primera es una inserción de nueve residuos en la misma región en donde se localiza la inserción de tripanosomátidos y la segunda, es una inserción de doce residuos hacia el extremo amino terminal (ver figura 23).

4.6.2. Identificación de motivos conservados para los ligandos de profilina.

Thorn et al. (1997) identificaron a 18 residuos como aminoácidos conservados en 80% de las profilinas. De estos, la mitad tienen una función demostrada en la interacción con ligandos ricos en prolina (ver figura 23); otros

cinco parecen tener un papel en el mantenimiento de la estructura terciara de la proteína y solo tres están involucrados en la unión a actina de acuerdo al modelo bovino.

En el caso de *T. cruzi* se pueden identificar sólo 6 de los 21 (28.6%) sitios de unión a actina reportados por Shutt et al. 1993 para la profilina bovina (3 residuos idénticos y 3 son cambios conservados), ver tabla IV. En cambio el dominio de unión a PLP parece estar muy conservado con todos los residuos esperados presentes (11 idénticos y 1 conservado). De los 3 sitios que se sabe se requieren para interactuar con PIP₂, se encontró que uno de ellos es idéntico, uno está conservado y uno parece ser exclusivo de las actinas bovina y humana.

Tabla V. Conservación de aminoácidos de profilina de *T.cruzi* involucrados en la unión a ligandos

Ligando	Residuos conservados con respecto al modelo bovino
Actina	Aminoácidos idénticos: S ₅₉ *, K ₆₈ V ₁₂₉ N ₁₃₅ Aminoácidos conservados: L ₇₂ , Q ₇₃ , K ₈₁ , K ₈₆ , N ₁₃₀ Aminoácidos semiconservados: S ₆₀ , G ₉₂ , A ₁₃₂ , S ₁₃₆ , R ₁₄₀ Aminoácidos no conservados: K ₅₈ , F ₇₀ , G ₇₁ , G ₈₈ , D ₁₃₃ , K ₁₃₉
Poli-L-prolina	Aminoácidos idénticos: W ₃ , Y ₆ , D ₈ , I ₂₂ , G ₂₄ , W ₃₁ , L ₁₄₅ , Y ₁₅₀ Aminoácidos conservados: S ₂ , Q ₄
PIP ₂	Aminoácidos idénticos: D ₈ Aminoácidos conservados: K ₈₆

*S₅₉ es un aminoácido no conservado con bovino pero idéntico al presente en *S.cerevisiae*. Ya que Eads et al. 1998, identificaron que este residuo en *S.cerevisiae* interviene en la interacción con actina, se considero como aminoácido conservado.



Figura 23. **Alineamiento de profilinas seleccionadas.** Alineamiento de profilinas de tripanosomátidos, de algunos organismos relacionados, y de aquellos de los que se encuentra estructura cristalográfica mediante CLUSTALW. Los aminoácidos sombreados representan residuos conservados en más del 80% de las profilinas (Thorn et al. 1997). Los residuos conservados con función estructural se marcan en café. Los residuos en azul son aquellos que participan en la unión con ligandos ricos en L prolina. En rojo, se muestran los residuos asociados a unión a actina basados en el modelo cristalográfico bovino (por lo que en esta especie se encuentran en cajas). En rosa, se señalan el residuo involucrado tanto a unión a ligandos ricos en prolina como a PIP2, en verde oscuro se resalta el residuo involucrado en unión tanto a actina como a PIP2 y en verde claro un residuo identificado en profilina humana involucrado en la unión a PIP2. Residuos subrayados indican funcionalidad demostrados en estudios de mutagénesis dirigida. En el cuadro se muestra la inserción de 19 aminoácidos presente en tripanosomátidos. El diagrama ubicado encima de la secuencia corresponde a la estructura secundaria de la profilina de *A. castellani* usada para el modelaje de esta proteína en *T. cruzi*, en ovalo se muestran las estructuras secundarias alfa hélice y en flecha la hoja beta plegada.

4.6.3. Predicción de la estructura terciaria.

Para modelar la probable estructura terciaria de profilina de *T. cruzi*, se utilizó el programa MODELER. Primero, se seleccionaron aquellas proteínas de las cuales se cuenta con una estructura cristalográfica reportada, seleccionando del templado que reunió los mejores criterios sugeridos por Sali y Blundell, 1993, ver tabla VI. El primer criterio de selección fue un rango de resolución cristalográfica menor a 3 Å (e idealmente esperado es 1 Å). El segundo criterio de selección fue un adecuado porcentaje de identidad, los templados 3nul, 1acf, 1cqa y 1yprA presentan una identidad < 50 % por lo que fueron descartados como templados. 1g5uA muestra el mayor porcentaje de identidad pero presenta un factor de resolución fuera del esperado de todos los templados candidatos, por lo que se descartó de la selección. Finalmente, se decidió seleccionar a la estructura de la profilina II de *Acanthamoeba castellani* (PDB 1f2kA) por un grado de identidad con la profilina de *T. cruzi* (61%) por su factor de resolución cristalográfica aceptable de 2.3 Å.

Tabla VI. *Profilinas con estructura cristalográfica conocida.* Se indica en paréntesis las isoformas de profilina y sombreado se indica la estructura seleccionada para la predicción del modelo.

PDB	Resolución cristalográfica	Porcentaje de identidad	Organismo
3nul	1.6 Å	28%	<i>Arabidopsis thaliana</i> (1)
1cqa	2.4 Å	24%	<i>Birch pollen</i>
1g5uA	3.1 Å	67%	<i>Hevea brasiliensis</i> (1)
1acf	2.0 Å	15%	<i>Acanthamoeba castellani</i> (1)
1f2kA	2.3 Å	61%	<i>Acanthamoeba castellani</i> (2)
1yprA	2.3 Å	44%	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (2)

Una vez seleccionado el mejor modelo (PDB 1f2kA [*A.castellani*]) se utilizó el programa de Modeller para que, en base a esta estructura, se realizara la predicción de un modelo por homología para la profilina de *T. cruzi*, ver figura 24.

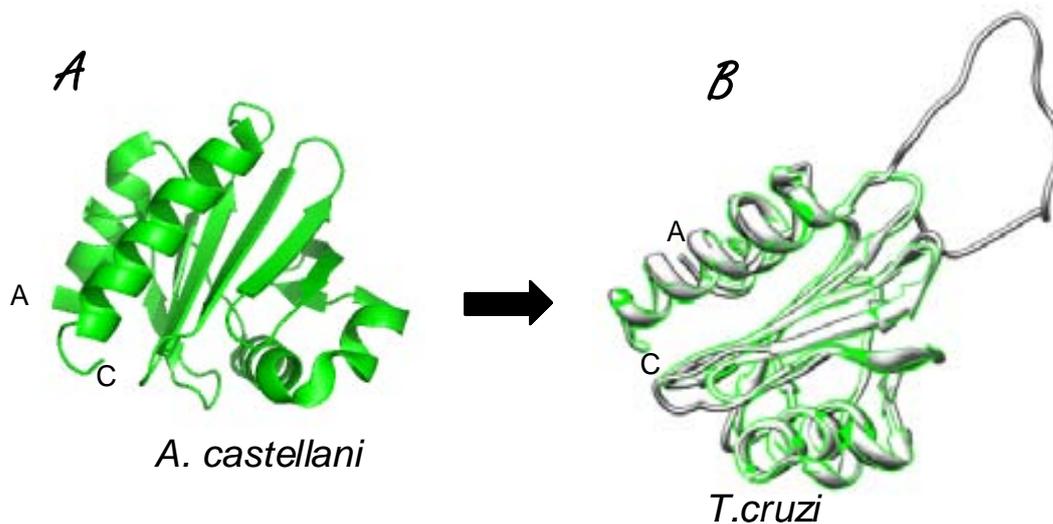


Figura 24. **Alineamiento estructural entre profilinas de *A. castellani*- *T. cruzi*.** (A) La estructura cristalográfica de *A. castellani* (PDB ID: 1f2kA) se indica en color verde y (B) la predicción de la estructura terciaria de profilina de *T. cruzi* en gris empalmada con el templado en verde (extremo amino A y extremo carboxilo C)

El modelo generado es una proteína globular que contiene las 4 α -hélices y 7 hojas beta plegadas presentes en las profilinas, llama la atención la presencia de una asa que corresponde a la inserción de 19 aminoácidos presente solo en *T. cruzi*. Esta región no contiene estructura secundaria definida ya que está no está presente en el modelo seleccionado. Se determinó la posible estructura secundaria de esta región utilizando el programa PSIPRED V2.6 (Jones, 1999). De acuerdo a la predicción de este programa la inserción puede ser plegada como alfa hélice, la cual puede estar influenciada con las interacciones del resto de la proteína. Para conocer la estructura real de esta inserción, se necesita cristalizar la proteína experimentalmente.

Los motivos conservados de unión a ligandos de profilina dentro de la conformación estructural de *T. cruzi* es similar a los que contienen en la estructura de profilina de la *A. castellani* reportada cristalográficamente (figura 25).

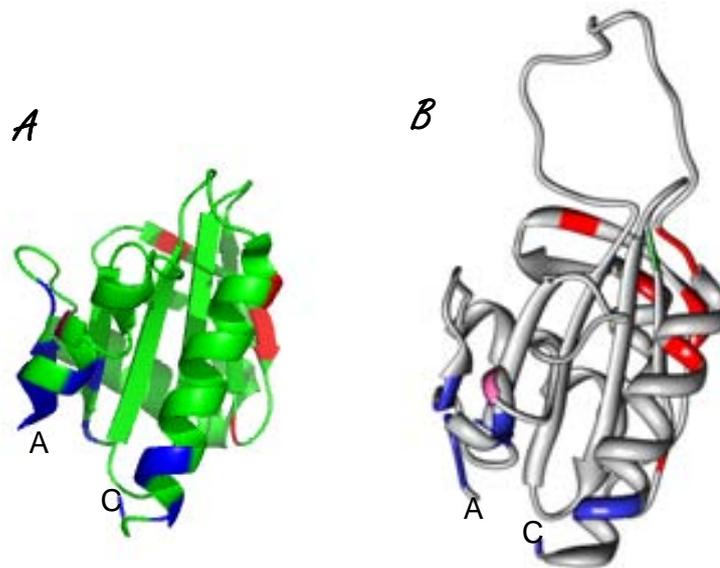


Figura 25. **Residuos funcionales de interacción con los tres ligandos (actina, rojo; poli-L prolina, azul; PIP2 verde y rosa).** (A) Estructura terciaria de profilina en *A. castellanii* (verde) y predicción del modelo de *T. cruzi* (gris)

El modelo obtenido (figura 24 B) se evaluó por dos formas: una valoración interna, referido a la estequiometría del modelo (distancias entre enlaces, ángulos de enlace y ángulos diédricos); y otra externa, que es la evaluación del plegamiento. La evaluación interna predice si el templado es correcto y se obtiene al comparar los puntos de corte Z-score para las estructuras del modelo y templado calculados por el programa. El Z-score del templado es de -15.17 y del modelo -12.99, la comparación de ambos valores se consideran aceptables dentro de la validación realizada. La predicción de profilina de *T. cruzi* también fue sujeto a una validación externa con Pro-SA, que evalúa la estereoquímica de todo el modelo por ventanas de 20 residuos que forman parte de una estructura y que hace el análisis comparativo con parámetros experimentales obtenidos de Rayos X y Resonancia Magnética Nuclear (NMR), ver figura 25 (Wiederstein y Sippl, 2007).

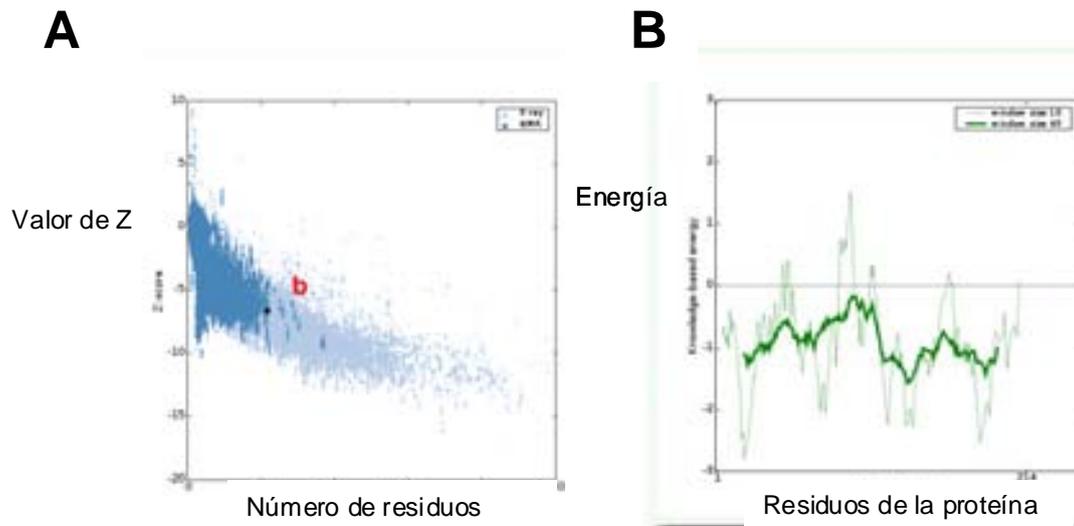


Figura 26. **Validación externa del modelo teórico de profilina *T. cruzi* mediante el programa Pro-SA.** (A) Valor de Z obtenido (•) de la estructura de profilina de *T. cruzi* comparado, con valores de Z experimentales de otras profilinas cuya estructura se determinó por medio de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y de rayos X. (B) Nivel de energía de los residuos en la predicción del modelo de *T. cruzi*.

5. DISCUSIÓN.

Profilina es una proteína importante en la regulación del citoesqueleto de actina, favoreciendo la elongación de microfilamentos cuando se necesitan y secuestrando actina en ausencia de estímulos de polimerización. La regulación de esta función se lleva a cabo por dos mecanismos, uno a través de su activación por sus ligandos y el segundo por la expresión de diferentes isoformas. En tripanosomátidos, el sistema de regulación de los microfilamentos de actina parece contener pocos elementos (Berriman et al., 2005). De las proteínas de unión a actina globular, sólo se identificaron cuatro clases de genes: los que codifican para profilina, para el factor despolimerizante de actina (ADF)/cofilina, twinfilina y la proteína asociada a ciclasa (CAP)/Srv. En los tres tripanosomátidos de los cuales se cuenta con información genómica, sólo ha sido posible identificar una sola isoforma de profilina incluyendo a *T. cruzi*. Hemos analizado las secuencias de los dos marcos de lectura abierta que codifican para las dos variantes alélicas de profilina en este organismo. Aunque existen ocho cambios en su secuencia nucleotídica todos ellos son conservados por lo que codifican para proteínas idénticas. Esto contrasta con lo que ocurre con un gran número de otros genes de *T. cruzi* CL Brener donde las diferencias alélicas contribuyen a la diversidad proteica. En profilina existe la posibilidad de isoformas determinadas por modificaciones post-traduccionales en particular formas fosforiladas (Vemuri y Singh, 2001), las cuales tendrán que ser demostradas experimentalmente en *T. cruzi*.

El proyecto de genoma de *T. cruzi*, aunque liberado y publicado, todavía no está finalizado. Debido a la presencia de abundantes regiones repetidas, aún no ha sido posible ensamblar todas las secuencias, ni siquiera ha sido posible definir con exactitud el número de cromosomas presentes (El-Sayed et al. 2005a). Por esta razón, es importante acabar de definir el contexto genómico de los diferentes genes a estudiar. En el caso de profilina, nuestros estudios permitieron el ensamblaje de cinco contigs (dos del alelo Esmeraldo y tres del

haplotipo No Esmeraldo), localizando al gen que codifica para profilina en la cuarta posición de un conjunto de al menos once marcos de lectura abierta codificados en la misma hebra (ver figura 27). La hibridación de cromosomas con una sonda de profilina identificó que el gene está presente en cromosomas homólogos de tamaño diferentes. La variación en el tamaño de cromosomas homólogos ya ha sido previamente reportada. Tal es el caso de los genes que codifican para la proteína ribosomal S4 reportados por nuestro grupo (Hernández et al., 1998). Se ha especulado que la diferencia en tamaños en estos cromosomas puede deberse a la presencia de elementos móviles, elementos repetidos, a duplicaciones o deleciones génicas presentes en cada haplotipo (El-Sayed et al. 2005a)

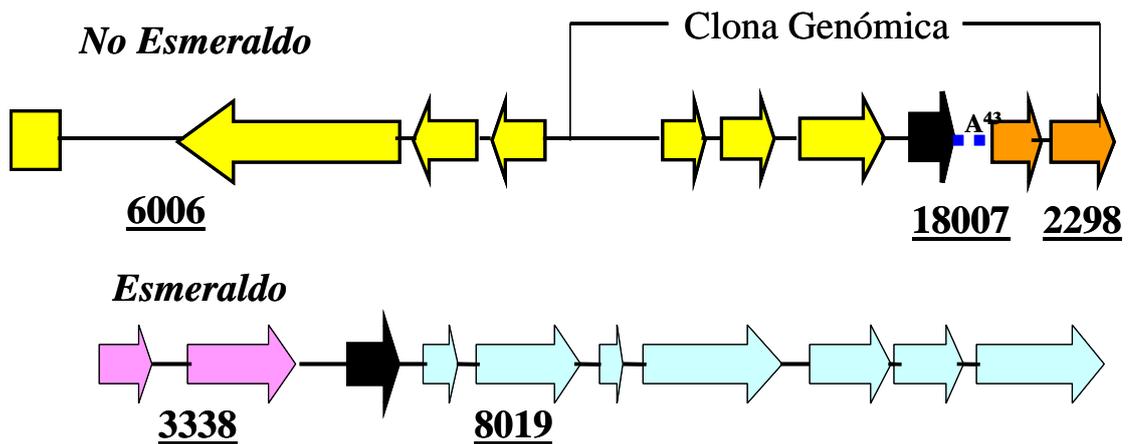


Figura 27. *Organización genómica de la región codificadora de profilina incluyendo la información obtenida de los contigs identificados mediante el análisis de secuencia de la región río abajo de profilina.* Cada uno de los cinco contigs ensamblados se muestran en colores diferentes. El único marco de lectura abierto resaltado en negro corresponde a profilina.

La expresión de los genes que codifican para profilina en *T. cruzi* no ha sido estudiada previamente. Este trabajo demuestra que el gen de profilina se transcribe como un mensajero poli adenilado de 0.7kb. Además demostramos que el transcrito primario es madurado mediante trans-splicing y poliadenilación, e identificamos los sitios de procesamiento, los cuales parecen comportarse de manera canónica. Campos et al. (2008) reportaron que la longitud de la región

no traducida 5' es menor a 50 nt (con una media de 39.5 nt) y que la longitud de la región no traducida 3' tiene una media de 137 nt, con una longitud promedio de 264 nt lo que sugiere que algunos transcritos tienen un 3' largo. La longitud de estas regiones no traducidas presentes en los transcritos de profilina son muy similares a la media para ambos casos. La vida media de los mensajeros de profilina se prolonga durante la fase estacionaria de crecimiento lo que apoya la hipótesis de que *T. cruzi* modula la degradación de los mensajeros necesarios para el mantenimiento celular en condiciones donde no hay síntesis significativa de nuevos transcritos como ocurre en la fase estacionaria (Cevallos et al., 2003).

La generación de proteínas recombinantes ha sido una herramienta ampliamente utilizada para estudiar la expresión y regulación de proteínas. Estas proteínas recombinantes pueden ser utilizadas para obtener anticuerpos policlonales o monoclonales los cuales permiten realizar estudios de inmunolocalización e inmuno precipitación. La expresión de proteínas recombinantes con elementos de fusión en el organismo de interés puede ser una técnica útil para estudiar el papel biológico de estas proteínas. Su expresión intracelular puede ser identificada a través del elemento de fusión ya sea directamente (como en el caso de proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes) o indirectamente con anticuerpos contra el elemento de fusión (tag) (Di Nardo et al., 2000). Además, estas proteínas pueden utilizarse en ensayos de pull-down para caracterizar los potenciales complejos funcionales que pudieran llegar a formarse, como sería el caso de la unión de profilina con forminas y las diferentes isoformas de actinas (Kursula et al. 2008). En el presente trabajo se consiguieron dos construcciones plasmídicas que codifican para la profilina completa o para un fragmento que incluye los aminoácidos 56 a 104. El vector pQE-30 contiene un promotor optimizado para su expresión que es eficientemente regulado; y las proteínas recombinantes se inducen por la presencia de IPTG al unirse a la proteína represora *lac*. Desafortunadamente no se identificaron las condiciones adecuadas para su expresión en *E. coli*. Entre los motivos por los cuales no se expresan las proteínas recombinantes se

encuentran la inestabilidad del plásmido recombinante la secuencia del gene, estabilidad y eficiencia en la traducibilidad del RNAm, diferencias en el uso de codones entre el gene de la proteína recombinante y el de *E.coli*, degradación de la proteína por proteasas y toxicidad de la proteína en el hospedero. En nuestro caso se descartó experimentalmente la inestabilidad plásmidica y se espera que no haya problemas de traducibilidad ya que el vector contiene las secuencias para el reconocimiento del transcrito por ribosomas. Las otras posibilidades requieren ser investigadas experimentalmente. Otras estrategias a considerar es la purificación de la proteína nativa por cromatografía de afinidad a PLP (Linberg et al. 1988), la cual podría ser utilizada tanto para la producción de anticuerpos como los estudios de afinidad con ligandos conocidos. Así como, la expresión de la proteína fusionada a un tag y expresada en *T.cruzi*.

La secuencia deducida de aminoácidos de profilina en los tripanosomátidos está conservada, incluyendo la presencia de una inserción de 19 residuos previamente identificada en *T. brucei*. Fue posible identificar todos los residuos que se sabe son importantes para la interacción de profilina con proteínas ricas en prolina. Además están conservados los 2 residuos que estudios funcionales han demostrado son importantes en la interacción con fosfatidil inosoles. Como se ha descrito para otras profilinas, los sitios de unión a actina están menos conservados, lo cual puede tener repercusiones en la afinidad de la profilina por diferentes isoformas de actina.

Nuestro modelo de estructura terciaria predice una proteína globular que contiene los elementos descritos en otras profilinas. Llama la atención la presencia de la inserción, la cual aparece como un asa, pero que pudiera llegar a plegarse como una alfa hélice. El sitio de la inserción es muy cercano al área de unión a actina y a la arginina 77 (correspondiente a la arginina 88 en bovino) involucrada en la unión a fosfatidil inositol. Las consecuencias funcionales de esta inserción en la afinidad de la profilina de tripanosomátidos tanto con actina como PIP2 necesitan

ser evaluadas experimentalmente. Por su localización es menos probable que la inserción interfiera con la unión a proteínas ricas en prolina.

En el genoma de *T. cruzi* se ha reportado la presencia del complejo Arp2/Arp3, sin embargo, sus activadores convencionales como las WASPs, que se sabe interactúan con profilina, no están presentes. Esto sugiere que los mecanismos de interacción de profilina con el complejo Arp2/Arp3 y sus activadores son diferentes en estos organismos. En la literatura se ha propuesto que las proteínas relacionadas a actina, incluyendo Arp2 y Arp3, debido a su semejanza estructural y al grado de conservación de sus residuos, son capaces de unirse a profilina (Jockusch et al 2007). Sin embargo, no existen muchos datos experimentales que demuestren dicha interacción. De hecho, el complejo Arp2/Arp3 fue identificado inicialmente mediante cromatografía de afinidad para profilina (Machesky et al., 1994). Sin embargo estudios de Mullins et al (1998) demostraron experimentalmente que profilina se une al complejo Arp2/Arp3 por la directa interacción solo con Arp2. La capacidad de otras proteínas relacionadas a actina de unirse directamente a profilina no ha sido demostrada experimentalmente.

En resumen, hemos demostrado que la profilina de *T. cruzi* en particular y tripanosomátidos en general, tiene diferencias estructurales importantes que ameritan mayor estudio en su capacidad de relacionarse con actina y proteínas relacionadas a actina y a su regulación por fosfatidil inositoles.

6. CONCLUSIONES.

1. El gen de profilina clonado de la cepa CL Brener- genoma híbrido- corresponde al haplotipo No Esmeraldo.
2. Profilina es parte de un cistrón transcripcional de al menos 11 elementos, los cuales en su mayoría corresponden a proteínas hipotéticas de función desconocida.
3. El gen de profilina se expresa como un transcrito poliadenilado de 700 bases tamaño suficiente para codificar para una proteína de 150 aa.
4. Durante la fase estacionaria el transcrito se estabiliza lo que apoya la hipótesis del laboratorio sobre un fenómeno global de regulación en el que la estabilización de los transcritos se estabilizan durante la fase estacionaria.
5. Se predice un modelo estructural de la profilina de tripanosomátidos con los elementos típicos de estas proteínas. Se identificó una inserción cercana al sitio de unión de actina y de fosfatidil inositoles que probablemente influye en su función.
6. Se obtuvieron contrucciones de vectores de expresión para la profilina recombinante y péptido recombinante.

7. PERSPECTIVAS.

- Optimizar protocolos de inducción para la expresión de la proteína recombinante.
- La purificación de la proteína nativa por cromatografía de afinidad a PLP para la inmunización y producción de suero policlonal, así como, estudios de afinidad de la profilina nativa.
- Expresión en epimastigotes de *T.cruzi* de la proteína fusionada a un tag, la cual puede utilizarse para estudios de localización celular y en ensayos de pull-down para caracterizar los potenciales complejos funcionales que pudieran llegar a formarse, como sería el caso de la unión de profilina con forminas y las diferentes isoformas de actinas.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell 4a ed. Garland. Capítulo XVI "The Cytoskeleton" 907-982.

Agabian N. 1990. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61(7): 1157-1160.

Aparicio-Fabre R., Guillén G., Estrada G., Olivares-Grajales, Gurrola G., Sánchez F. 2006. Profilin tyrosine phosphorylation in poly-L-proline binding regions inhibits binding to phosphoinositide 3-kinase in *Phaseolus vulgaris*. *Plant J.* 47: 491-500.

Arasada R., Gloss A., Tunggal B., Joseph J.M., Rieger D., Mondal S. 2007. Profilin isoforms in *Dictyostellium discoideum*. *Biochim Biophys Acta.* 1773: 631-41

Atwood III, Weatherly D., Minning T., Bundy B., Cavola C., Opperdoes F., Orlando R. Tarleton R. 2005. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. *Science* 309(5733): 473.

Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler C., Blandin G., Renauld H., Bartholomeu D., Lennard N., Caler E., Hamlin N., Haas B., Bohme U., Hannick L., Aslett M., Shallom J., Bringaud F., Brooks K., Carrington M., Cherevach I., Chillingworth T., Churcher C., Clark L., Corton C., Cronin A., Davies R., Doggett J., Djikeng A., Feldblyum T., Field M., Fraser A., Goodhead I., Hance Z., Harper D., Harris B., Hauser H., Hostetler J., Ivens A., Jagels K., Johnson D., Johnson K., Kerhornou A., Koo H., Larke N., Landfear S., Larkin C., Leech V., Line A., Lord A., Macleod A., Mooney P., Moule S., Martin D., Morgan G., Mungall K., Norbertczak H., Ormond D., Pai G., Peacock C., Peterson J., Quail M., Rabbinowitsch E., Rajandream M., Reitter C.,

Salzberg S., Sanders M., Schobel S., Sharp S., Simmonds M., Simpson A., Tallon L., Turner C., Tait A., Tivey A., Van Aken S., Walker D., Wanless D., Wang S., White B., White O., Whitehead S., Woodward J., Wortman J., Adams M., Embley T., Gull K., Ullu E., Barry J., Fairlamb A., Opperdoes F., Barrel B., Donelson J., May N., Fraser C., Melville S., y El-Sayed N. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 309: 416-22.

Bogitsh B., Ribero-Rodriguez R., Carter C. 1995. In Vitro effects of mannan and cytochalasin D on uptake of horseradish peroxidase and [¹⁴C] sucrose by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J.Parasitol.* 81: 144-148.

Boothroyd J., Cross G. 1982. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene* 20: 281.

Buekens P., Almendares O., Carlier., Dumonteil E., Eberhard M., Gamboa-Leon R., James M., Padilla N., Wesson D., Xiong X. 2007. Mother-to-child transmission of Chagas' disease in North America: why don't we do more? *Matern Child Health J.* 12(3): 283-6.

Campos P.C., Bartholomeu D.C., DaRocha W.D., Cerqueira G.C., Texeira S.M.R. 2008. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 38(12): 1383-9.

Carlier M.F., Jean C., Rieger K.J. Lenfant M., Pantolini D. 1993. Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90(11): 5034-5038.

- Cevallos A.M., López-Villaseñor I., Espinosa N., Herrera J., Hernández R. 2003. *Trypanosoma cruzi*: Allelic comparisons of the actin genes analysis of their transcripts. *Exp Parasitol.* 103: 27-34.
- Cevallos A.M., Pérez-Escobar M., Espinosa N., Herrera J., López-Villaseñor I., Hernández R. 2005. The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase. *FEMS Microbiol Lett.* 246: 259-264.
- De Melo L., Eisele N., Nepomuceno-Silva J, Gazos U. 2006. TcRho1, the *Trypanosoma cruzi* Rho Homologue, regulates cell-adhesion properties: Evidence for conserved function. *Biochem Biophys Res Commun.* 345: 617-622.
- De Melo L., Sant'Anna C., Reis S., Lourenc D., De Souza W., Lopes U., Silva E. 2008 Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. *Parasitology.* 135(8):955-65.
- De Souza W., Meza I., Martínez-Palomo A., Sabanero M., Souto-Padron T. Meirelles M. 1983. *Trypanosoma cruzi*: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes. *J Parasitol.* 69: 138-142.
- De Souza W. 1999. A short review on 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*. *Current Pharmaceutical Design.* 8: 269-285.

Di Nardo A., Gareus R., Kwiatkowski D. y Witke W. 2000. Alternative splicing of the Mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J Cell Science*. 113: 3795-3803.

Eads J.C., Mahoney N.M., Vorobiev S., Brensnick A.N., Wen K.K., Rubenstein P.A., Haarer B.K., Almo S.C. 1998. Structure determination and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* profilin. *Biochemistry*. 37: 11171-11181.

El-Sayed N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Oseagawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Petterson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B. 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309(5733): 409-415.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC,

Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 2005b. 309(5733): 404-9.

Estévez A.M., Simpson L. 1999. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a review. *Gene* 240: 247-260.

Ferron F., Rebowski G., Lee S., Domínguez R. 2007. Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* 26(21): 4597-4606.

Federov A., Ball T., Valenta R., Almo S. 1997. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure* 5: 33-45.

Figueroa-Angulo E., Cevallos A., Zentella A., Villaseñor-López I., Hernández R. 2006. Potential regulatory elements in *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1759(10): 497-501.

García E.S., Azambuja P. 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today.* 7(9): 240-244.

García-Salcedo J., Perez-Morga D., Gijon P., Dilbeck V., Pays E., Nolan D. 2004. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 23: 780-789.

Geiduschek P., Kassavetis G. 2001. The RNA polymerase III transcription apparatus. *J. Mol. Biol.* 310:1.

- Gilinger G., Bellofatto V. 2001. *Trypanosoma* spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nuc. Acid. Res.* 29(7): 1556-1564.
- Goldschmidt-Clermont P., Furman M.I., Wachsstock D., Safer D., Nachmias V.T., Pollard T.D. 1992. The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells *Mol. Cell Biol.* 3: 1015-1024.
- Guillén G., Valdés-López V., Noguez R., Olivares J., Rodríguez-Zapata L., Pérez H., Vidali L., Villanueva M., Sánchez F. 1999. Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated *in vivo* by phosphorylation on tyrosine residues. *Plant J.* 19(5): 497-508.
- Gull K. 1999. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol.* 53: 629-655.
- Gull K. 2003. Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies. *Curr Opin Microbiol.* 6(4): 365-70. Review
- Guzmán-Bracho C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in México: an update. *Trends in Parasitology.* 17:372-376.
- Haile S., Papadopoulou B. 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* 10 (6): 569-577.
- Harbeck B., Hüttelmaier S., Jockusch B.M., Illenberger S. 2000. Phosphorylation of the vasolidator stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J. Biol. Chem.* 275: 30817-30825.

Hernández R., Palacios S., Herrera J., Martínez-Calvillo S., López-Villaseñor I. 1998. The deduced primary structure of ribosomal protein S4 from *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1395: 321-325.

Hernández-Rivas R., Florencio-Martínez L.E., Martínez-Salazar M., Martínez-Calvillo S. 2007. Gene expresión and transcriptional machinery in trypanosomatid and apicomplexa parasites. *Adv. Immunobiol Parasitic Dis* 2: 313-337.

Hilpelä P, Vartiainen MK, Lappalainen P. 2004. Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Curr Top Microbiol Immunol*. 282: 117-63.

Huang J., Van der Ploeg L.H.. 1991. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J*. 10(12): 3877-85

Ivens A.C., Peacock C.S., Worthey E.A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M.A., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S.M., Bianchetti G., Borzym K., Bothe G., Bruschi C.V., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R.M., Cronin A., Cruz A.K., Davies R.M., De Gaudenzi J., Dobson D.E., Duesterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasch A.C., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J.C., Müller-Auer S., Munden H., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'neil S., Pentony M., Pohl T.M., Price C., Purnelle B., Quail M.A., Rabinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J.C., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D.C., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S.,

Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D.F., Blackwell J.M., Stuart K.D., Barrell B., Myler P.J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309(5733): 436-42

Jockusch B., Murk K., Rothkegel M. 2007. The profile of profilins. *Rev. Physiol Biochem Pharmacol*. 159: 131-149.

Jones D.T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*. 292(2): 195-202.

Kovar D.R., Drobak B.K., Staiger C.J. 2000. Maize profilin isoforms are functionally distinct. *Plant Cell* 12:583-598.

Kursula I., Kursula P., Ganter M., Panjikar S., Matuschewski K., Schüler H. 2008. Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure*. 16(11): 1638-48.

Lambrechts A., Braun A., Jonckheere V., Aszodi A., Lanier L., Robbens J., Colen I., Vandekerckhove J., Fässler R., Ampe C. 2000. Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol. Cell Biol*. 20 (21),8209–8219.

Lambrechts A., Jonckheere V., Dewitte D., Vandekerckhove J., Ampe C. 2002. Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochem*. 3: 12.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

- LeBowitz J., Smith H., Rusche L., Beverley S. 1993. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* 7: 996-1007.
- Luo H., Gilinger G., Mukherjee D., Bellofatto V. 1999. Transcription initiation at the TATA-less spliced leader RNA gene promoter requires at least two DNA-binding proteins and tripartite architecture that includes an initiator element. *J. Biol. Chem.* 274: 1947-31954.
- McCurdy D.W., Kovar D.R., Staiger C.J. 2001. Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma.* 215(1-4): 89-104. Review.
- Machesky L.M., Atkinson S.J., Ampe C., Vandekerckhove J., Pollard T.D. 1994. Purification of cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarase. *J Cell Biol.* 127: 107-115.
- Mahoney N.M., Almo S.C. 1998. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human platelet profilin complexed with an oligo proline peptide. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 54 (Pt1): 108-110.
- Medina-Acosta E., Cross G. 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple mini-prep procedure. *Molecular and Biochemical Parasitology* 59: 327-330.
- Miles M., Souza A., Pova M., Shaw J., Laison R. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821.
- Mortara RA. 1989. Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. *J Protozool.* 36(1): 8-13.

- Mullins R.D., Kelleher J.F., Xu J., and Pollard T.D., 1998b. Arp2/3 Complex from *Acanthamoeba* binds profilin and cross-links actin. *Mol Biol Cell*. 841(9): 841-852.
- Nunes L.R., de Carvalho M.R., Buck G.A. 1997 *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol Biochem Parasitol*. 86(2): 211-24.
- Olivera M.A., Guillén O.F., Cruz V.S., Hernández B.N., Pérez G.E., Guzmán C.C., Reyes A., Monteón V. 2006. Serological and parasitological screening of *Trypanosoma cruzi* infection in mothers and newborns living in two Chagasic Areas of Mexico. *Arch Med Res*. 37: 774-777.
- Paavilainen V.O., Bertling E., Falck S., Lappalainen P. 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol*. 14(7): 386-394.
- Pantolini D., Carlier M.F. 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4. *Cell* 75: 10007-1014.
- Parada H., Carrasco H.A., Añez N., Fuenmayor C., Inglessis I. 1997. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol*. 60(1): 49-54.
- Pellé R., Murphy N. 1993. Northern hybridization: rapid and simple electrophoretic conditions. *Nucleic Acids Research*. 21: 2783–2784.
- Pérez-Escobar M. 2008. “Busqueda de posibles mecanismos de regulación de los niveles de equilibrio de RNAm en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*”.

Tesis para obtener el grado dirigida por el doctor Dr. Roberto Jose Rafael Hernández Fernández. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pettersen E., Goddard T., Huang C., Couch G., Greenblatt D., Meng E., and Ferrin T. (2004). UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis." *J. Comput. Chem.* 25(13):1605-1612.

Polet D., Lambreshts A., Orio K., Mah A., Peelman F., Vandekerckhove J. 2006. *Caenorhabditis elegans* express three functional profilins in tissue-specific manner. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63: 14-28.

Polet D., Lambrechts A., Vandepoele K., Vandekerckhove J., Ampe C. 2007. On the origin and evolution of vertebrate and viral profilin. *FEBS Lett.* 581: 211-217.

Pollard, T.D. and Cooper, J.A. 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem.* 55: 987-1035.

Pruyne D., Evangelista M., Yang C., Bi E., Zigmond S., Bretscher A., Boone C. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science.* 297: 612-615.

Riveron A., Lopez-Canovas L., Herrera Isidron J., Ruiz-Esquivel L., Higginson-Clarke D., Nao M., Valdes-Acosta F. 1994. Molecular Weight and Kinetic Parameters of DNA Undergoing Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Arch. Med. Res.* 25(2): 193-198.

Sahasrabuddhe A.A., Bajpai V.K., Gupta C.M. 2004. A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterization, subcellular localization and association with subpellicular microtubules. *Mol Biochem Parasitol.* 134(1): 105-14.

- Sali A., Blundell T. 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J.Mol.Biol.* 243: 770-815.
- Sandoval-Ruiz C.A., Zumaquero-Rios J.L., Rojas-Soto O.R. 2008. Predicting geographic and ecological distributions of triatomine species in the southern Mexican state of Puebla using ecological niche modeling. *J Med Entomol.* 45(3): 540-546.
- Sathish K., Padma B., Veerendra Munugalavadla, Bhargavi V., Radhika K.V.N., Wasia R, Sairam M., Singh S. S. 2004. Phosphorylation of profilin regulates its interaction with actin and poly (L-proline). *Cell Signalling.* 16: 589-596.
- Schlüter K., Jockusch B., Rothkegel M. 1998. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1359: 97-109.
- Schutt C., Myslik J., Rozycki M., Goonesekere N., Lindberg U. 1993. The structure of crystalline profilin- β actin. *Nature* 365: 810-816.
- Schwartz and Cantor. 1984 Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell* 37: 67–75.
- Segura-Kato Y. 2008. “Expresión y localización de la proteína actina en los diferentes estudios de *Trypanosoma cruzi*”. Dra. Ana María Cevallos Gaos. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Silva R.A., Bartholomeu D.C., Teixeira S.M. 2006. Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 36 (1): 87-96.

- Shi H., Djukeng A., Mark T., Wirtz E., Tschudi C., Ullu E. 2000. Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. RNA 6: 1069-1076.
- Sohn R.H., Chen J., Koblan K.S., Bray P.F., Goldschmidt-Clemont P.J. 1995. Localization of a binding site for phosphatidylinositol-4,5-biphosphate on human profilin. J Biol Chem. 270: 21114-21120.
- Southern E.M. 1974. An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. Anal Biochem. 62(1): 317-318.
- Stevens J., Noyes H., Schofield C., Gibson W. 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. Advances in Parasitol. 48: 1-55.
- Stradal T.E., Rottner K., Disanza A., Confalonieri S., Innocenti M., Scita G. 2004. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. Trends Cell Biol. 14: 303-311.
- Stiles J., Hicock P., Shah P., Meade J. 1999. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in Leishmania. Ann Trop Med Parasitol. 93(8):781-807.
- Thorn K.S., Christensen H.E.M., Shigeta R., Huddler D., Shalaby L., Lindberg U., Chua N.H., Schutt C.E. 1997. The crystal structure of major allergen from plants. Structure 5: 19-32.
- Tiwari S.C., Polito V.S. 1988. The initiation and organization of microtubules in germinating pear (*Pyrus communis L.*) pollen. Protoplasma 147: 5-15.

- Towbin H., Staechelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76: 4350-4354.
- Valenta R., Duchêne M., Pettenburger K., Sillaber C., Valent P., Bettelheim P., Breitenbach M., Rumpold H., Kraft D., Scheirner O. 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 253: 557-560.
- Vemuri B., Singh S. 2001. Protein kinase C isozyme-specific phosphorylation of profilin. *Cellular Signalling* 13: 433-439.
- Waghbi M., Keramidas M., Bailly S., Degraeve W., Mendonca-Lima L., Soeiro M., Meirelles M., Paciornick S., Araujo-Jorge T., Feige J. 2005. Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am. J. Pathol.* 167: 993-1003.
- Watt S., Kular G., Fleming I., Downes C., Lucocq J. 2002. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta 1. *Biochem J.* 363: 657-666.
- WHO. The World Health Report, 2002 (World Health Organization, Genova, 2002).
- Wiederstein M., Sippl M.J. 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research* 35, W407-W410.
- Wilkes D.E., Otto J.J. 2000. Molecular cloning profilin from *Tetrahymena thermofila*. *Gene*. 246: 295-301.

- Wilson W., Seebeck T. 1997. Identification of a profilin homologue in *Trypanosoma brucei* by complementation screening. *Gene* 187, 201-209.
- Witke W. 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* 14: 461-469.
- Wright A., Feng S., Martin D., Lynn D. 1999. Phylogenetic position of kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi* and *Cryptobia salmoitica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol* 99: 69-76.
- Wolven A.K., Belmont L.D., Mahoney N.M., Almo S.C., Drubin D.G. 2000. In vivo importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin. *J Cell Biol.* 150(4): 895-904.
- Yarmola E., Bubb M. 2006. Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 31(4): 197-205.
- Yu F.X., Sun H.Q., Janmey P.A., Yin H.L. 1992. Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. *J Biol Chem.* 267(21): 14616-21.
- Zeledón R., Alvarenga N., Schosinsky K. 1997. In "Chagas Disease". Pan American Health Organization. Publ. 347, 59.
- Zingales B, Pereira M, Oliveira R, Almeida K, Umezawa E, Souto R, Vargas N, Cano M, da Silveira J, Nehme N, Morel C, Brener Z, Macedo A. 1997. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trop.* 68(2):159-73.