



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM.

**“Expresión y localización de la proteína actina en los
diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA

Yayoi Xóchitl Segura Kato

Directora de tesis:

Dra. Ana Maria Cevallos Gaos

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de Abril de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **YAYOI XOCHITL SEGURA KATO** con número de cuenta 95379780 con la tesis titulada "**Expresión y localización de la proteína actina en los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi***", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS**.


Presidente: DRA. REBECA GEORGINA MANNING CELA
Vocal: DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
Secretario: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS
Suplente: DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D.F. a 3 de Junio de 2008.


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber apoyado y financiado mis estudios de Maestría (beca 199344).

Al Programa de Apoyo a Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA, UNAM, por el apoyo financiero del Proyecto “Análisis estructural y funcional de actina en *Trypanosoma cruzi*” (No. IN213906-3).

A los miembros de mi Comité Tutorial:

A mi asesora, la Dra. Ana María Cevallos Gaos
Al Dr. Roberto Hernández Fernández
Al Dr. Luis Felipe Jiménez García

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

AGRADECIMIENTOS.

De manera muy especial quiero agradecer a mi asesora, a la Dra. Ana María Cevallos Gaos, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Por confiar en mí este proyecto, por sus enseñanzas, consejos, dedicación y el apoyo que he recibido de ella para realizar esta tesis.

Al Dr. Roberto Hernández Fernández, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Gracias por permitirme ser parte de este proyecto, por brindarme su apoyo, sus conocimientos y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Imelda López Villaseñor, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Gracias por sus comentarios y consejos, fueron muy valiosos en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Horacio Merchant Larios, del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Muchas gracias por el gran apoyo prestado con la microscopía confocal y la microscopía electrónica durante la realización de esta investigación. También, quiero agradecer sus comentarios y consejos valiosos que enriquecieron este proyecto.

A la Dra. Rebeca Manning Cela del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, por las facilidades de espacio, equipo y material de laboratorio, y por el gran apoyo y asesoría brindados en el trabajo experimental, en especial en la obtención de las formas infectivas de *T. cruzi*.

A mis sinodales, a la Dra. Rebeca Manning Cela, a la Dra. Imelda López Villaseñor, al Dr. Luis Felipe Jiménez García, al Dr. Roberto Hernández Fernández, por sus valiosos comentarios al revisar esta tesis.

A la Q.F.B. Juliana Herrera López por el apoyo técnico recibido en el trabajo experimental.

A la Q.F.B. Claudia Márquez y al M.C. Luis Alberto Hernández del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV por el apoyo brindados en la infección de fibroblastos con *T. cruzi* y en la obtención de formas infectivas del parásito.

Al Lic. en I.B.B. José René Escalona Mújica, quien preparó la proteína recombinante GST-actina de *T. cruzi* para generar el suero policlonal empleado en este estudio.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, para quienes estuvieron y para los que se quedan: a Juliana, a Karelia, a Mariana y a Julio, gracias por su valioso apoyo técnico y académico, y por sus consejos e impulsos a la vida. A Elisa, a Miriam, a Vania, a Josefina y a Tomás, muchas gracias a todos por los momentos compartidos.

DEDICATORIA.

A mis padres: Tatsuko Kato Ishii y Antonio Segura Miranda.

*Les agradezco enormemente que me hayan apoyado en todas mis decisiones,
por su ayuda incondicional, por su confianza y por su cariño.
Este triunfo no es sólo mío sino también de ustedes.*

A mis hermanas: Hikaru Citlali y Aiko Xochipilli.

Por estar siempre conmigo.

A mi sobrino: Daniel Hyde López Segura.

Eres la luz de nuestras vidas.

A la memoria de mis abuelitos paternos: Oliva Miranda Guzmán y Noé Segura Román.

A mis abuelitos maternos: Masako Kato e Ichitaro Kato.

A mis tíos, primos y sobrinos.

A todos mis amigos.

*A todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron al logro de una de
mis metas, la Maestría.*

Muchas gracias a todos por el cariño, apoyo e impulso brindados.

CONTENIDO.

| | Página: |
|--|---------|
| Abreviaturas. ----- | i |
| Lista de cuadros. ----- | ii |
| Lista de figuras. ----- | iii |
| Lista de tablas. ----- | iv |
| Lista de cuadros (Apéndices). ----- | v |
| Lista de figuras (Apéndices). ----- | vi |
| Lista de tablas (Apéndices). ----- | vii |
| Lista de gráficas (Apéndices). ----- | viii |
| | |
| 1. Resumen.----- | 1 |
| 2. Abstract.----- | 2 |
| 3. Introducción. ----- | 3 |
| 3.1 Generalidades sobre <i>Trypanosoma cruzi</i> (<i>T. cruzi</i>). ----- | 4 |
| 3.2. Estadios de <i>T. cruzi</i> .----- | 5 |
| 3.2.1 El estadio epimastigote. ----- | 6 |
| 3.2.2 El estadio tripomastigote. ----- | 7 |
| 3.2.3 El estadio amastigote. ----- | 7 |
| 3.3 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .----- | 8 |
| 3.4 Estructuras celulares de <i>T. cruzi</i> . ----- | 11 |
| 3.5 Vía de endocitosis, transporte vesicular y exocitosis o secreción en <i>T. cruzi</i> .----- | 13 |
| 3.6 La Tripanosomiasis Americana. ----- | 14 |
| 3.6.1 Transmisión. ----- | 14 |
| 3.6.2 Fases de la enfermedad de Chagas. ----- | 15 |
| a) Fase aguda. ----- | 15 |
| b) Fase intermedia o indeterminada.----- | 15 |
| c) Fase crónica.----- | 16 |
| 3.6.3 Diagnóstico. ----- | 16 |
| 3.6.4 Tratamiento. ----- | 17 |
| 3.6.5 Estrategias de control de la enfermedad de Chagas. ----- | 17 |

| | |
|---|----|
| 3.6.6 La enfermedad de Chagas en México. ----- | 18 |
| 3.7 El citoesqueleto. ----- | 19 |
| 3.8 Actina. ----- | 19 |
| 3.8.1 Generalidades. ----- | 19 |
| 3.8.2 ¿Cómo se estudia actina en las células? ----- | 29 |
| 3.8.3 Funciones arquetípicas de actina en células de metazoarios y su papel en protozoarios. ----- | 30 |
| 3.8.4 Movimiento dependiente de actina. ----- | 33 |
| 3.8.5 Señalización. ----- | 34 |
| 3.9 Actina en Tripanosomátidos. ----- | 35 |
| 4. Justificación. ----- | 45 |
| 5. Hipótesis. ----- | 46 |
| 6. Objetivos. ----- | 47 |
| 6.1 Objetivo general. ----- | 47 |
| 6.2 Objetivos específicos. ----- | 47 |
| 7. Metodología. ----- | 48 |
| 7.1 Análisis de la secuencia de actina de <i>T. cruzi</i> . ----- | 48 |
| 7.2 Obtención de diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> . ----- | 49 |
| 7.2.1 Obtención de epimastigotes de fase media logarítmica y fase estacionaria. ----- | 49 |
| 7.2.2 Obtención de amastigotes y tripomastigotes. ----- | 49 |
| a) Obtención de amastigotes y tripomastigotes por centrifugación. ----- | 49 |
| b) Obtención de tripomastigotes por centrifugación usando el anticuerpo específico de amastigotes 2C2B6LSP4. ----- | 50 |
| c) Obtención de amastigotes intracelulares. ----- | 50 |
| 7.2.3 Tinción con HEMA3 de los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> obtenidos. ----- | 50 |
| 7.3 Ensayos <i>western blot</i> . ----- | 51 |
| 7.3.1 Obtención de lisados totales de las diferentes células para <i>western blot</i> . ----- | 51 |
| 7.3.2 Obtención de fracciones subcelulares de <i>T. cruzi</i> para <i>western blot</i> . ----- | 51 |
| 7.3.3 Electroforesis de proteínas y <i>western blot</i> . ----- | 51 |
| 7.4 Inmunodetección de actina con microscopía confocal ----- | 53 |

| | |
|--|-----|
| 8. Resultados. ----- | 54 |
| 8.1 Análisis de la secuencia de actina de <i>T. cruzi</i> . ----- | 54 |
| 8.2 Obtención de los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> . ----- | 59 |
| 8.3 Caracterización del suero policlonal contra la proteína recombinante GST-actina de <i>T. cruzi</i> . ----- | 61 |
| 8.4 Solubilidad de actina de <i>T. cruzi</i> al tratamiento con Tritón X-100. ----- | 63 |
| 8.5 Presencia y localización de actina en los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> . – | 65 |
| 8.5.1 Actina en epimastigotes de fase media logarítmica y fase estacionaria de la curva de crecimiento de cultivos axénicos. ----- | 65 |
| 8.5.2 Presencia y localización de actina en los estadios amastigote y tripomastigote. ----- | 69 |
| a) Localización de actina en tripomastigotes liberados al sobrenadante de fibroblastos en cultivo infectados con <i>T. cruzi</i> . ----- | 70 |
| b) Localización de actina en amastigotes liberados al sobrenadante de fibroblastos en cultivo infectados con <i>T. cruzi</i> . ----- | 70 |
| c) Localización de actina en parásitos intracelulares. ----- | 70 |
| 9. Discusión. ----- | 77 |
| 10. Conclusiones. ----- | 84 |
| 11. Perspectivas. ----- | 86 |
| 12. Referencias. ----- | 87 |
| 13. Apéndices. ----- | 100 |

ABREVIATURAS.

| | |
|---|----------------------------|
| Acido clorhídrico | HCl |
| Acido desoxirribonucleico | ARN |
| Acido ribonucleico | ADN |
| Adenosin difosfato | ADP |
| Adenosin trifosfato | ATP |
| Agua | H ₂ O |
| Albumina de suero bovino | BSA |
| CD | Citocalasina D |
| Centímetros | cm |
| Ciclo de la división celular 42 | CDC42 |
| Cinasa de unión a RhoA α y β | ROK α y ROK β |
| Desoxirribonucleasa pancreática bovina I | DNasal |
| Dimetil sulfóxido | DMSO |
| Dodecill sulfato de sodio | SDS |
| Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima | ELISA |
| Factor de crecimiento transformante beta | TGF β |
| Factor despolimerizante de actina | ADF |
| Fase estacionaria | Fase E |
| Fase media logarítmica | Fase ML |
| Fenilmetilsulfonilfluoruro - inhibidor de proteasas | PMSF |
| Fuerza centrífuga | xg |
| Glutación S-transferasa | GST |
| Grados centígrados | °C |
| Hora(s) | hr |
| Inmunoglobulina G | IgG |
| Isotiocianato de fluoresceína | FITC |
| JAS | Jasplakinolide |
| Kilo base (s) | kb |
| Kilo Dalton | kDa |
| Lipoproteína de baja densidad | LDL |
| Magnesio | Mg ²⁺ |
| Medio mínimo esencial | MEM |
| Medio mínimo esencial Dulbecco | DMEM |
| Microgramos | μ g |
| Microlitros | μ l |
| Micrometros | μ m |
| Micromolar | μ M |
| Microscopía electrónica de transmisión | MET |
| Mili Amperes | mAmp |
| Mililitro | ml |
| Milimolar | mM |
| Minuto(s) | min |
| Monofosfato de adenosina cíclico | AMPc |
| Nanómetros | nm |
| National Center for Biotechnology Information | NCBI |
| Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido | NAD(P)H |
| Peroxidasa de rábano | HRP |
| Peso / volumen | p/v |
| Porina mitocondrial | POR1 |
| Proteína asociada a la adenilato ciclasa | CAP |

| | |
|--|-------|
| Proteína asociada a RAS | Rab1 |
| Proteína de superficie estadio-específica 4 | Ssp4 |
| Proteína de unión a actina | ABP |
| Proteína del sistema de secreción 23 | Sec23 |
| Proteína del sistema de secreción 31 | Sec31 |
| Proteína del síndrome Wiskott-Aldrich | WASP |
| Proteína homóloga de RAS | Rho |
| Proteína que interactúa con WASP | WIP |
| Proteína verde fluorescente | GFP |
| Proteínas de superficie asociadas a mucinas | MASP |
| Proteínas relacionadas a actina | ARP |
| Reacción en cadena de la polimerasa | PCR |
| Residuos aminoácido | aa |
| Ribonucleoproteína | RNP |
| Segundos (s) | seg |
| Solución amortiguadora de fosfatos | PBS |
| Substrato C3 de la toxina botulínica relacionado a Ras | Rac |
| Suero normal de cabra | NGS |
| Temperatura ambiente | TA |
| Transportador de glucosa 1 | GLUT1 |
| Triptosa de infusión de hígado | LIT |
| Volumen/volumen | v/v |
| Volts | V |

En este trabajo se utilizó como abreviatura de los aminoácidos los símbolos de una letra asignados por la IUPAC.

| Nombre | Símbolo |
|-----------------|---------|
| Acido aspártico | D |
| Acido glutámico | E |
| Alanina | A |
| Arginina | R |
| Asparagina | N |
| Cisteína | C |
| Fenilalanina | F |
| Glutamina | Q |
| Glicina | G |
| Histidina | H |
| Isoleucina | I |
| Leucina | L |
| Lisina | K |
| Metionina | M |
| Prolina | P |
| Serina | S |
| Treonina | T |
| Triptófano | W |
| Tirosina | Y |
| Valina | V |

LISTA DE CUADROS.

| Cuadro: Título: | Página: |
|---|---------|
| 1. La familia de Actina. La actina convencional y las actinas divergentes, las ARPs. ----- | 20 |
| 2. La desoxiribonucleasa pancreática bovina I o DNasa I. ----- | 29 |
| 3. Ciclos de vida de <i>T. brucei</i> , <i>Leishmania</i> y <i>H. samuelpessoai</i> . ----- | 36 |
| 4. Phyre. ----- | 48 |

LISTA DE FIGURAS.

| Figura: | Título: | Página: |
|---------|---|---------|
| Página: | | |
| 1. | Los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> según su morfología: epimastigote, tripomastigote y amastigote. ----- | 6 |
| 2. | Ciclo de vida y ciclo intracelular de <i>T. cruzi</i> . ----- | 9 |
| 3 | A) Estructura tridimensional de actina. B) Dibujo de varias moléculas de actina constituyendo un microfilamento. C) Microfilamentos vistos por medio del microscopio electrónico. ----- | 21 |
| 4. | Distribución de los subdominios en la secuencia primaria de la proteína α actina de conejo.----- | 21 |
| 5. | Estructuras celulares que contienen filamentos de actina en células de metazoarios y en levadura. ----- | 32 |
| 6. | Componentes del citoesqueleto de actina de tripanosomátidos según la secuencia de sus genomas. ----- | 42 |
| 7. | Alineamiento de las secuencias de α actina de músculo esquelético de conejo (377 aa) y la actina de <i>T. cruzi</i> (376 aa). ----- | 57 |
| 8. | Modelo estructural de la actina de <i>T. cruzi</i> . ----- | 58 |
| 9. | Curva de crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> . ----- | 59 |
| 10. | Epimastigotes de fase ML y fase E teñidos con HEMA3. ----- | 60 |
| 11. | Fracciones de tripomastigotes y amastigotes teñidos con HEMA3. ----- | 60 |
| 12. A) | Secuencia de residuos de aminoácidos del fragmento carboxilo terminal de actina de mamíferos contra el cual se desarrolló el anticuerpo comercial.----- | 61 |

LISTA DE FIGURAS (continuación).

| Figura: Título: | Página: |
|---|---------|
| 12 B) Reactividad de un anticuerpo heterólogo anti-actina comercial en: 1. Lisados totales de cultivo de <i>E. coli</i> no inducido. 2. Lisados totales de cultivo de <i>E. coli</i> inducido con IPTG. 3. Proteína recombinante GST-Actina eluida. 4. Lisados totales de células HeLa. 5. Lisados totales de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> . ----- | 61 |
| 13. Detección de actina en lisados totales de <i>T. cruzi</i> . ----- | 62 |
| 14 A) Reactividad del suero anti actina recombinante de <i>T. cruzi</i> con otros protozoarios. B) Reactividad con células NIH3T3. ----- | 63 |
| 15. Fracciones soluble e insoluble en Tritón X-100 de actina y α tubulina de <i>T. cruzi</i> . ----- | 64 |
| 16. Detección de actina y α tubulina en lisados totales de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> . ----- | 66 |
| 17. Inmunotinción de actina de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de fase media logarítmica con el suero anti actina recombinante de <i>T. cruzi</i> .----- | 67 |
| 18. Inmunotinción de actina de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de fase Estacionaria con el suero anti actina recombinante de <i>T. cruzi</i> . ----- | 68 |
| 19 Detección de actina y α tubulina (como control de carga) en lisados totales de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> . ----- | 69 |
| 20 Inmunotinción de actina de tripomastigotes sanguíneos liberados al sobrenadante de fibroblastos en cultivo infectados con <i>T. cruzi</i> con el suero anti actina recombinante de <i>T. cruzi</i> . ----- | 71 |
| 21 Inmunotinción de actina de amastigotes liberados al sobrenadante dfibroblastos en cultivo infectados con <i>T. cruzi</i> con el suero anti actina recombinante de <i>T. cruzi</i> . ----- | 72 |
| 22 Inmunotinción de amastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i> de fibroblastos infectados. ----- | 73-74 |
| 23. Inmunotinción de formas intermedias amastigotes-tripomastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i> de fibroblastos infectados. ----- | 75 |
| 24. Inmunotinción de formas intermedias intracelulares con morfología cercana a tripomastigotes en un fibroblasto infectado. ----- | 76 |
| 25. Localización de actina en los diferentes estadios del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> . ----- | 79 |

LISTA DE TABLAS.

| Tabla: | Título: | Página: |
|--------|--|---------|
| 1. | Residuos involucrados en varias interacciones y funciones de actina. ---- | 23 |
| 2. | Proteínas de unión a actina (ABPs, Actin Binding Proteins) y sus funciones.----- | 26-28 |
| 3. | Agentes más empleados que afectan el citoesqueleto de actina. ----- | 30 |
| 4. | Resumen de algunas características, propiedades y funciones de actinas de los tripanosomátidos <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>Herpetomonas</i> y <i>Leishmania</i> , y de ciliados y apicomplexos en general. ----- | 40 |
| 5. | Anticuerpos y suero empleados, sus diluciones, y muestras de lisados celulares empleados en los diferentes ensayos <i>western blot</i> . ----- | 52 |
| 6. | Porcentajes de identidad y similitud entre los diferentes subdominios de la α actina de músculo esquelético de conejo y la actina de <i>T. cruzi</i> . ---- | 56 |
| 7. | Actinas de las células con las que se probó la reactividad cruzada del suero policlonal contra actina recombinante de <i>T. cruzi</i> . ----- | 62 |

LISTA DE CUADROS (Apéndices).

| Cuadro: | Título: | Página: |
|---------|---|---------|
| A. | Técnica post-inclusión y pre-inclusión para MET. ----- | 110 |
| B. | Técnicas para la endocitosis de BSA y su observación con MET. ----- | 112 |
| C. | Ensayos de adherencia 1. ----- | 115 |
| D. | Ensayos de adherencia 2. ----- | 117 |
| E. | MET de epimastigotes tratados con JAS. ----- | 121 |

LISTA DE FIGURAS (Apéndices).

| Figura: | Título: | Página: |
|---------|--|---------|
| 1. | Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de actina de <i>T. cruzi</i> con la actina de otros organismos. ----- | 100 |
| 2. | Micrografías d MET. Epimastigotes. ----- | 108 |
| 3. | Micrografías de MET de ensayos de inmunolocalización de actina post-inclusión y pre-inclusión. ----- | 109 |
| 4. | Micrografías de MET. Epimastigotes incubados con BSA-oro durante 2 hr y 30 min. ----- | 113 |
| 5. | Micrografías de MET de epimastigotes incubados con BSA-oro en MEM durante 4 hr y posteriormente incubados en medio LIT durante hr, 6 hr y 24 hr. ----- | 114 |
| 6. | Epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de fase media logarítmica (ML) adheridos y teñidos con el suero anti actina recombinante de <i>T. cruzi</i> . ----- | 116 |
| 7. | <i>Western blot</i> , tratamiento con JAS. ----- | 120 |
| 8. | Micrografías de MET, tratamiento con JAS. ----- | 122 |

LISTA DE GRÁFICAS (Apéndices).

| Figura: | Título: | Página: |
|---------|--|---------|
| 1. | Efecto de la cantidad de epimastigotes en la adhesión. ----- | 117 |
| 2. | Efecto del tiempo de incubación en la adhesión. ----- | 118 |
| 3. | Efecto del tratamiento con CD y DMSO en la adhesión de epimastigotes incubados en LIT sin suero. ----- | 119 |

1. RESUMEN.

Actina es una proteína globular de aproximadamente 42 kDa, altamente conservada entre los eucariontes, cuya función principal es formar polímeros o microfilamentos de actina, siendo uno de los principales componentes estructurales de las células. El protozooario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente etiológico de la enfermedad de Chagas en el humano, presenta un ciclo de vida complejo en el cual están presentes dos grupos de hospederos (chinchas hematófagas de la familia Reduviidae y un grupo variado de vertebrados), y tres principales formas del parásito que se diferencian morfológicamente: a) el epimastigote, que es una forma flagelada replicativa; b) el tripomastigote, una forma flagelada no replicativa; y c) el amastigote, una forma replicativa, redonda, sin flagelo, y de localización intracelular. El citoesqueleto de *T. cruzi* se distingue de otras células eucariontes debido a que está formado principalmente por microtúbulos, polímeros de la proteína tubulina. Aunque se sabe que actina de *T. cruzi* está conservada (su gen ya ha sido caracterizado), no se tiene evidencia clara de su localización, organización (no se han detectado microfilamentos en *T. cruzi*) y función en éste organismo. En este trabajo se empleó un suero policlonal generado contra una proteína actina recombinante de *T. cruzi* para determinar la presencia y la localización con microscopía confocal de la proteína actina en los diferentes estadios de *T. cruzi*. Los resultados demuestran que actina está presente en los tres estadios, y que su localización varía a través del ciclo de vida de *T. cruzi*. En el estadio epimastigote se identificaron una concentración de actina en la región correspondiente al bolsillo flagelar (lo cual es congruente con un reporte sobre la posible participación de actina en la endocitosis en este estadio), varias áreas de focalización de actina en el flagelo. En el estadio amastigote la señal y la localización de concentraciones de actina fueron heterogéneas en la población, mientras que en el estadio tripomastigote la distribución de actina fue homogénea en todo el parásito; por otro lado, formas intermedias entre amastigotes y tripomastigotes contenidas en fibroblastos infectados, tuvieron una señal intensa de actina en toda el parásito. Es posible que las diferencias en la localización subcelular de actina entre los distintos estadios reflejen diferencias funcionales de la proteína, que podrán determinarse empleando fármacos con efecto en el citoesqueleto de actina y generando *knock outs* de actina de *T. cruzi*. Finalmente, actina de *T. cruzi* parece estar principalmente en un estado soluble y polimerizándose en estructuras simples. Esta característica en la distribución puede deberse a las propiedades intrínsecas de la proteína, ya que no están muy conservadas las regiones asociadas a la polimerización, y al conjunto de proteínas que interactúan y regulan actina en el parásito.

2. ABSTRACT.

Actin is a globular protein of approximately 42 kDa, highly conserved between eukaryotes, whose main function is to form actin polymers or microfilaments, being one of the main structural components of these cells. The protozoa *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), the etiologic agent of Chagas disease in the human, presents a complex life cycle in which two groups of hosts are present (Reduviidae insects and a varied group of vertebrates). Three main forms of the parasite that are morphologically different have been described: a) epimastigote, that is a flagellated replicative form; b) trypomastigote, a flagellated non-replicative form; and c) amastigote, a replicative, round form, without flagellum, and of intracellular localization. The cytoskeleton of *T. cruzi* may be distinguished from other eukaryote cells in that it is mainly formed by microtubules, polymers of tubulin protein. Although it is known that actin of *T. cruzi* is conserved (its gene has already been characterized), there is no clear evidence of its localization, organization (microfilaments in *T. cruzi* have not been detected) and function in the life cycle of this organism. In this work, a polyclonal serum generated against a recombinant protein of actin *T. cruzi* was used to determine the presence and the localization with confocal microscopy of actin protein in the different stages of *T. cruzi*. The results demonstrate that actin protein is present in the three stages, and its localization varies through the life cycle of *T. cruzi*. In epimastigote stage, an actin concentration was identified in the region corresponding to the flagellar pocket, which is congruent with a report on the possible actin role in epimastigote endocytosis. Also, areas of actin focalization were detected in the flagellum of epimastigotes; since a functional study on a Rho protein in *T. cruzi* has associated indirectly actin in the process of adhesion to substrate through the flagellum, it would be interesting to study its role in adhesion. In amastigote stage, actin signal and actin concentrations localizations were heterogeneous in the population, whereas in the trypomastigote stage, actin distribution was homogeneous in all the parasite; on the other hand, intermediate forms between amastigotes and trypomastigotes contained in infected fibroblasts, had an intense actin signal in all the parasite. Differences in actin subcellular localization between the different *T. cruzi* stages possibly reflect functional differences of the protein, that will be determined using drugs with effect in the actin cytoskeleton and generating *T. cruzi* actin knock outs. Finally, the results of this work suggest that actin in *T. cruzi* seems to be mainly in a soluble state and polymerizing in simple structures. This characteristic in the distribution can be due to the intrinsic properties of the protein, since the regions associated to polymerization are not conserved, and to the protein cocktail that interact and regulate actin in the parasite.

3. INTRODUCCIÓN.

Actina es una proteína globular de 42 kDa, que se encuentra en el citoplasma en forma monomérica o polimerizada formando microfilamentos. Está altamente conservada entre los eucariontes y es el principal componente estructural del citoesqueleto en las células de estos organismos. Actina participa en muchas funciones celulares importantes, incluyendo la contracción muscular, el movimiento celular, la división celular y citocinesis, el movimiento de vesículas y organelos, la señalización celular, y en el establecimiento de uniones celulares y de la forma celular (Alberts *et al.*, 2002).

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) es un protozooario parásito de divergencia temprana con un ciclo de vida complejo que incluye dos hospederos, insectos vectores de la familia *Reduviidae* y vertebrados (incluyendo al humano, en el cual ocasiona la enfermedad de Chagas) y diferentes estadios de desarrollo con características morfológicas y funcionales particulares, el epimastigote, el tripomastigote y el amastigote. El citoesqueleto de *T. cruzi* es muy peculiar, ya que está básicamente formado por tubulina (Gull, 1999). Aunque se ha demostrado la conservación de actina en este organismo, no se han detectado microfilamentos ni se tiene evidencia clara de la localización y función de esta proteína en los diferentes estadios de *T. cruzi* (De Souza *et al.*, 1983; Mortara, 1989; Cevallos *et al.*, 2003).

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación se clonaron y caracterizaron los dos alelos que codifican para de actina de *T. cruzi* y se demostró su expresión como un ARN mensajero de 1.6 kb en el estadio epimastigote (Cevallos *et al.*, 2003). Se utilizó una de las clonas genómicas para amplificar la región codificada de actina y se clonó en un vector de expresión para generar una forma recombinante de la proteína actina de *T. cruzi*, que fue empleada para inmunizar un conejo y obtener un suero policlonal contra esta proteína. En el presente trabajo de tesis, este suero fue caracterizado y empleado en la inmunodetección de actina en los diferentes estadios de *T. cruzi*. Los resultados muestran la presencia y distribución de actina en tripomastigotes y amastigotes, y una localización más definida de la proteína en epimastigotes, mostrando concentraciones específicas no detectadas en estudios anteriores (De Souza *et al.*, 1983; Mortara, 1989).

3.1 Generalidades sobre *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

T. cruzi es un protozoario (organismos eucariontes de divergencia temprana) parásito unicelular miembro de la familia *Trypanosomatidae* (Ryan y Ray, 2004).

Clasificación taxonómica:

Dominio: *Eukaryota*

Reino: *Protozoa*

Fílum: *Euglenozoa*

Clase: *Kinetoplastea*

Orden *Trypanosomatida*

Familia: *Trypanosomatidae*

Género: *Trypanosoma*

Especie: *T. cruzi*

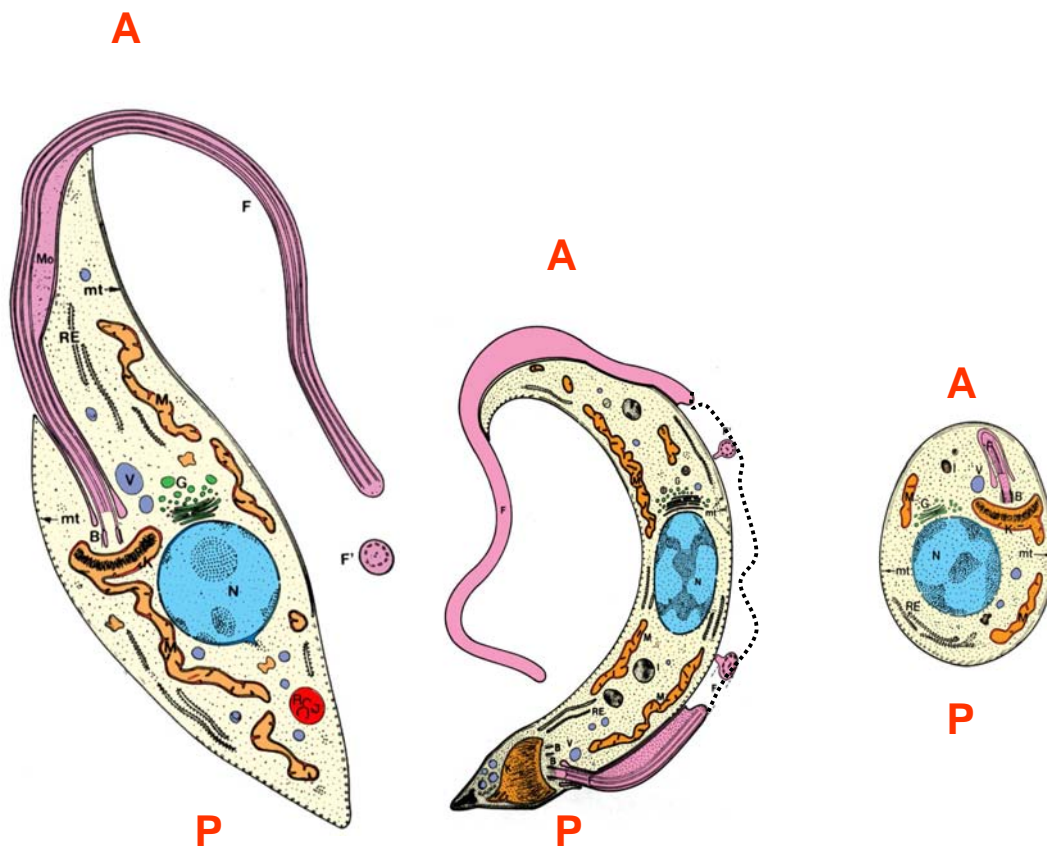
Los miembros de la familia *Trypanosomatidae* (triptanosomátidos) son parásitos con ciclos de vida complejos que incluyen diferentes formas morfológicas y varios hospederos (Ryan y Ray, 2004). Algunos tripanosomátidos incluyendo *T. cruzi* son agentes etiológicos de varias enfermedades humanas importantes, como lo son la enfermedad de Chagas en Latino América (*T. cruzi*), las leishmaniasis en varias regiones del mundo (*Leishmania*), y la enfermedad del sueño en África (*Trypanosoma brucei* [*T. brucei*]), por lo que su estudio ha tenido una importancia médica y económica (Ryan y Ray, 2004). Además, los tripanosomátidos presentan un número de peculiaridades biológicas que han hecho de ellos interesantes objetos de estudio. Por ejemplo, se han identificado estructuras celulares únicas en estos organismos, como el cinetoplasto, organelo constituido por el ADN de la única mitocondria del organismo, y el corset subpelicular de microtúbulos, red de polímeros de tubulina adosada a la membrana plasmática de la célula (De Souza 2002, revisión). También, se ha demostrado que la expresión génica en estos organismos tiene características especiales: en general, sus genes codificadores de proteínas carecen de intrones, están organizados en tandem y son transcritos en unidades policistrónicas; el control de la expresión génica opera a nivel post-transcripcional; el procesamiento de ARN mensajeros es a través del “trans-splicing” (proceso originalmente identificado en estos organismos), y sus ARN mensajeros mitocondriales presentan una edición muy particular (Vanhamme y Pays, 1995, revisión).

El taxon *T. cruzi* se ha clasificado en dos principales grupos o subespecies: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. *T. cruzi* I se ha asociado principalmente con el ciclo selvático y a la infección de marsupiales, mientras que *T. cruzi* II (sub-grupos: IIa, IIb, IIc, IId y IIe) con el ciclo doméstico y la infección de mamíferos de placenta. La cepa CL Brener de *T. cruzi*, miembro del subgrupo IIe que resultó ser un híbrido conteniendo tanto secuencias de *T. cruzi* I como de *T. cruzi* II, se seleccionó para secuenciar el genoma del parásito por ser una de las cepas mejor caracterizadas experimentalmente. La secuencia del genoma de *T. cruzi*, publicada en el 2005, revela que el genoma, diploide, tiene ~ 60 kb, la mitad de éste consiste de secuencias repetidas (como retrotransposones y genes de familias de moléculas de superficie del parásito) y contiene 22,570 genes codificadores de proteínas, 50 % de los cuales se desconoce su función (El-Sayed *et al.*, 2005). De manera interesante, el análisis del genoma ha identificado diferencias en varios procesos biológicos típicos en otros eucariontes como por ejemplo en la replicación, en la reparación del ADN, en el tráfico vesicular, y en el sistema de citoesqueleto, ya que el parásito carece de muchos homólogos de los componentes de éstos procesos o contiene sistemas complementarios a estos (Berriman *et al.*, 2005). También, se han descubierto nuevas vías bioquímicas, funciones estructurales y blancos potenciales para drogas y vacunas contra el parásito.

3.2 Estadios de *T. cruzi*.

Durante el ciclo de vida de *T. cruzi* se observan tres principales estadios o formas de desarrollo definidos morfológicamente: el estadio epimastigotes, el estadio tripomastigote, y el estadio amastigote (De Souza, 2002, revisión) - Figura 1 -. La definición morfológica de los estadios de *T. cruzi* (epimastigote, tripomastigote y amastigote) está basada en la presencia o la ausencia del flagelo; si el flagelo está presente, el nombre indica la posición de la célula de donde emerge el flagelo (bolsillo flagelar) relativa al núcleo: 1) Amastigote, flagelo muy reducido o ausente; 2) Epimastigote: flagelo anterior al núcleo, conectado por una membrana ondulante al cuerpo celular; 3) Tripomastigote: flagelo posterior al núcleo, conectado al cuerpo celular por una membrana ondulante larga. La posición del cinetoplasto en relación al núcleo también se utiliza para diferenciar epimastigotes de tripomastigotes, ya que en todos los estadios, el cinetoplasto se encuentra adyacente al cuerpo basal, de donde se origina el flagelo.

3.2.1 El estadio epimastigote. El epimastigote (Figura 1A) es un estadio flagelado, alargado y fusiforme, con una longitud de 20 a 40 μm y un grosor de 2-5 μm . Esta forma, que es móvil, presenta un flagelo largo que emerge directamente del citoplasma en la parte central de la célula; una parte del flagelo está unido a lo largo del cuerpo celular formando una pequeña membrana ondulante, y la otra parte se presenta libre. El epimastigote tiene un núcleo y un cinetoplasto (organelo constituido por el ADN de la única mitocondria del parásito) centrales. Su núcleo es redondo, con un tamaño de 2.5 μm . El cinetoplasto con forma de bastón, está localizado anterior al núcleo. Este estadio se divide por fisión binaria longitudinal. Los epimastigotes se observan en el intestino del hospedero invertebrado y en la fase logarítmica de cultivos axénicos (De Souza 2002, revisión).



A. Epimastigote

B. Tripomastigote

C. Amastigote

Figura 1. Los diferentes estadios de *T. cruzi* según su morfología: epimastigote, tripomastigote y amastigote. Se indican algunas de sus estructuras celulares. F: flagelo (F': imagen del corte transversal del flagelo). Mo: membrana ondulante. Mt: microtubulos. RE: retículo endoplásmico. M: mitocondria. G: aparato de Golgi. V: glicosoma. R: reservosoma. B: cuerpo basal. K: cinetoplasto. N: núcleo. I: acidocalcisoma. Las letras en rojo A y P indican regiones anterior y posterior de la célula. Figura modificada de Guzmán *et al.*, 1999.

3.2.2 El estadio tripomastigote. El tripomastigote (Figura 1B) es una forma flagelada, alargada y fusiforme, con un cuerpo celular más estrecho que el epimastigote. Tiene 18 a 25 μm de longitud y 2 μm de grosor. El movimiento de este estadio, que es considerablemente móvil con respecto al epimastigote, es dado por el flagelo que se origina en el extremo posterior del cuerpo celular y corre adherido a lo largo del cuerpo celular formando una membrana ondulante (que es más extensa que la del epimastigote); el flagelo se extiende más allá del cuerpo celular presentándose como un flagelo libre. El núcleo del tripomastigote es alargado y se localiza en la posición central de la célula. En el extremo posterior de la célula y alejado del núcleo, se localiza el cinetoplasto con forma de canasta. Es un estadio incapaz de dividirse. Puede ser observado en: 1) células de tejido y en la sangre del hospedero vertebrado - a estas formas se les conocen como tripomastigotes sanguíneos -, 2) en el intestino posterior, en las heces, y en la orina del hospedero invertebrado - tripomastigotes llamados metacíclicos -, 3) en la fase estacionaria de crecimiento de cultivos axénicos - también tripomastigotes metacíclicos -, y 4) en la fase líquida de cultivos celulares - tripomastigotes de cultivos celulares que son considerados como sanguíneos- (De Souza, 2002; revisión). A pesar del parecido morfológico entre tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes sanguíneos, sus diferencias funcionales se reflejan a nivel de expresión génica y de proteínas (Atwood III *et al.*, 2005). Por ejemplo, en los tripomastigotes sanguíneos, que circulan en el torrente sanguíneo y están expuestos a los efectores del sistema inmune del hospedero, predomina la expresión de múltiples miembros de grandes familias de moléculas de superficie como lo son las mucinas, las trans-sialidasas, y las proteínas de superficie asociadas a mucinas o MASP (de las siglas en inglés, Mucin-associated surface proteins). Los tripomastigotes metacíclicos expresan, pero de una manera menos predominante, un subconjunto estadio-específico de estas moléculas de superficie; en cambio, expresan de manera abundante enzimas y substratos importantes en la defensa antioxidante en *T. cruzi*, lo cual se ha asociado con la pre-adaptación de las formas metacíclicas para resistir el potencial de la explosión respiratoria de las células fagocíticas en el hospedero mamífero. Se ha reportado que las formas metacíclicas son más infectivas que las formas sanguíneas.

3.2.3 El estadio amastigote. El amastigote (Figura 1C) es una forma redonda, sin flagelo libre (por lo tanto carece de movimiento). Es un estadio intracelular de las células del hospedero vertebrado. En promedio, tiene una longitud de 6.5 μm y un grosor de 2.4 μm .

Su núcleo es redondo, y cerca de éste se encuentra el cinetoplasto formando un bastón. Se replica por fisión binaria simple y pueden ser infectivas para las células de los vertebrados (De Souza, 2002; revisión).

3.3 Ciclo de vida de *T. cruzi*.

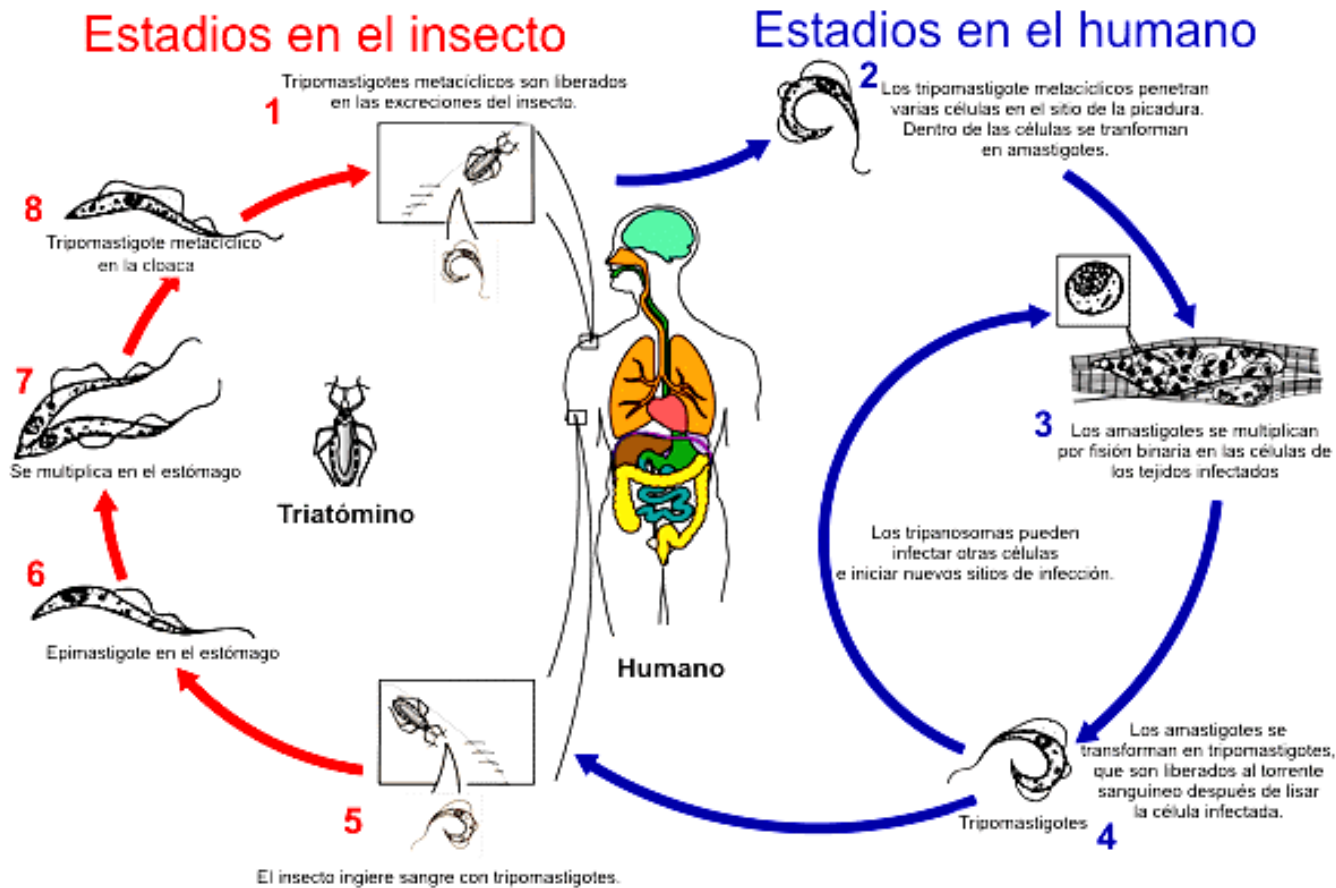
En el ciclo de vida de *T. cruzi* está bien documentado (De Souza, 2002, revisión; Tyler y Engman, 2001, revisión) e incluye un grupo de vectores invertebrados y un grupo de hospederos vertebrados:

- 1) Vectores invertebrados. Son insectos vectores de *T. cruzi*, hematófagos, del orden *Hemíptero*, familia *Reduviidae*, y subfamilia *Triatominae*. A pesar de que todas las especies *Triatominae* pueden ser vectores potenciales de la enfermedad y muchos están asociados en su transmisión selvática a mamíferos, solo un número contado de especies están asociadas con la transmisión a humanos (ciclo doméstico). Los tres vectores más importantes de la enfermedad de Chagas son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* y *Triatoma dimidiata*.
- 2) Hospederos vertebrados. En general, los vertebrados son hospederos de *T. cruzi*, entre estos se incluyen al hombre, algunos animales domésticos como perros, gatos, ratones, ratas, conejos, cobayos, puercos, ganado vacuno y caballo; y algunos reservorios naturales como armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos y primates silvestres.

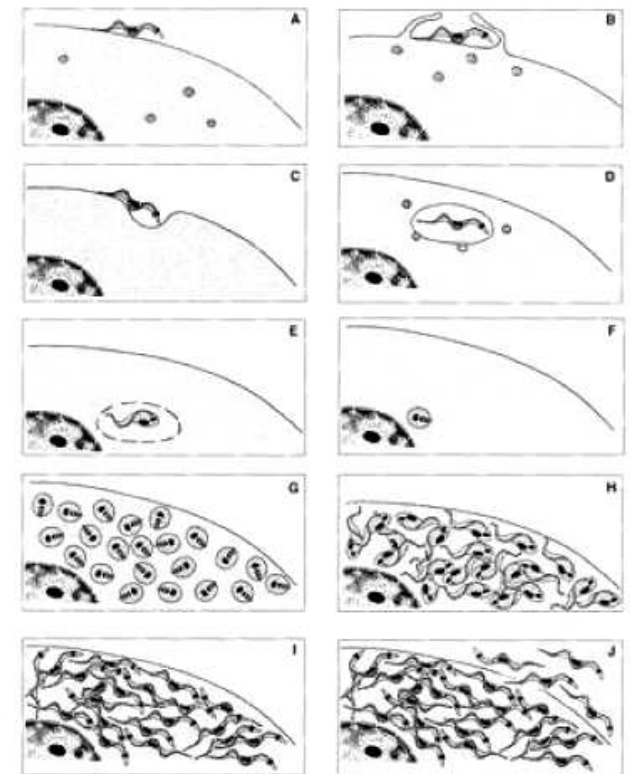
El ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 2A) inicia cuando el insecto triatómino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado. La sangre succionada contiene **tripomastigotes sanguíneos**, los cuales al llegar al tracto intestinal del vector se transforman en **epimastigotes**. Los epimastigotes se replican repetidamente por fisión binaria. Algunos epimastigotes migran a la parte terminal del intestino y a los túbulos de Malpighian; una proporción de estos epimastigotes se adhiere al epitelio de la cloaca del insecto y se transforman en **tripomastigotes metacíclicos** (proceso conocido como Metaciclogénesis). La metaciclogénesis es dependiente de AMPc (AMP cíclico) y de varios factores contenidos en la orina del insecto. Cuando el insecto vuelve a alimentarse,

Figura 2. A. Ciclo de vida de *T. cruzi*. El parásito infecta vertebrados, incluyendo al humano (ilustrado en esta figura), e insectos triatóminos. Figura tomada de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>. **B. Ciclo intracelular.** Vista esquemática de varias fases de la interacción de *T. cruzi* con células de vertebrados. Figura tomada de De Souza, 2002. Para más detalles consultar el texto.

A. Ciclo de vida



B. Ciclo intracelular



libera en sus excreciones (heces y orina) tripomastigotes metacíclicos. El ciclo de vida de *T. cruzi* dentro del insecto es completado en 2 a 4 semanas. Los tripomastigotes metacíclicos liberados pueden penetrar el cuerpo de los mamíferos a través de excoriaciones de la piel o por el contacto con la conjuntiva o con la mucosa. Una vez introducido en el hospedero, los tripomastigotes metacíclicos son capaces de invadir un gran rango de células nucleadas, aunque existe tropismo para cardiomiocitos y células de músculo liso. El proceso de invasión inicia con la adhesión del parásito a la célula hospedero (Figura 2B). Este paso involucra moléculas de ambas células (principalmente azúcares expuestos en la superficie) y una señalización bidireccional que inicialmente conduce a cambios en la membrana plasmática de las dos células. Las observaciones morfológicas han mostrado que el parásito siempre penetra la célula huésped a través de un proceso de endocitosis en el cual se forma una vacuola parasitófora. En células fagocíticas como los macrófagos, se forman proyecciones en la superficie celular como las observadas en la fagocitosis. En la invasión de células no fagocíticas esto no ocurre, sin embargo, señales dependientes de Ca^{2+} o del factor de crecimiento transformante β o TGF β (Transforming Growth Factor β) inducen re-arreglos de los microfilamentos de actina en la célula huésped y el reclutamiento de lisosomas hacia el punto de adhesión del parásito; estos lisosomas se fusionan con la membrana plasmática, primero formando una unión con el parásito, y después, formando un compartimento vacuolar, la vacuola parasitófora, que permite la entrada del parásito. Independientemente del mecanismo usado para penetrar la célula, el parásito reside en la vacuola parasitófora. La acidificación de la vacuola parasitófora, que resulta de la fusión de lisosomas, activa la transformación de tripomastigote metacíclico a **amastigote**. En este paso, en los macrófagos se activa la NAD(P)H oxidasa con la producción de productos derivados del oxígeno que pueden matar al parásito, si no lo logran matar, este continúa su ciclo intracelular. Luego, la membrana de la vacuola parasitófora es lisada por proteínas secretadas por el parásito (por ejemplo, la molécula tipo porina Tc-Tox) y el amastigote es liberado al citoplasma de la células hospedero, donde establece contacto directo con estructuras y organelos del citoplasma de la célula huésped, y prolifera dividiéndose repetidamente por fisión binaria (que se repite cada 12 a 14 hr). Cuando la célula hospedero se satura de amastigotes, estos inician su transformación a tripomastigotes sanguíneos vía una forma intermedia parecida al epimastigote. La diferenciación de la población de parásitos intracelulares no es sincrónica, por lo que a un determinado tiempo se pueden encontrar diferentes estadios entre los amastigotes y tripomastigotes. Al final

del ciclo intracelular, el movimiento flagelar intenso del tripomastigotes sanguíneo ayuda a romper la célula hospedero, y los parásitos son liberados al espacio intracelular alcanzando el sistema circulatorio (lo cual los acerca a células de otros tejidos). De ésta manera, los tripomastigotes sanguíneos pueden iniciar un nuevo ciclo de vida ya sea infectando nuevas células o al ser succionados con la sangre por un vector.

3.4 Estructuras celulares de *T. cruzi*.

En *T. cruzi* se han descrito estructuras celulares típicas de los eucariontes: **El núcleo**, cuya posición celular (ver estadios de *T. cruzi*) y conformación varía en los diferentes estadios, por ejemplo, en epimastigotes y amastigotes, la cromatina está localizada en la periferia nuclear y se observa un nucleolo central, en cambio, en tripomastigotes, la cromatina se dispersa y el nucleolo desaparece, dando al núcleo una apariencia homogénea y menos densa. **El retículo endoplásmico liso y el retículo endoplásmico rugoso** se localizan en la región perinuclear y en la región entre el núcleo y el bolsillo flagelar. **El aparato de Golgi**, formado de 3 a 10 cisternas, está presente también entre el núcleo y el cinetoplasto en la región cercana al bolsillo flagelar. Se observan **ribosomas** dispersos a través del citoplasma.

La superficie celular de *T. cruzi* está compuesta por un glicocálix distribuido uniformemente a través de la superficie de cuerpo celular y del flagelo, una bicapa lipídica conteniendo proteínas integrales de membrana y una red subpelicular de microtúbulos, una estructura del citoesqueleto única de los tripanosomátidos, que se describe a continuación.

El citoesqueleto de *T. cruzi* es muy peculiar, ya que está básicamente formado por tubulina (Gull, 1999). Ésta proteína se encuentra formando los microtúbulos de tres principales estructuras:

- a) **El corset, malla o red subpelicular de microtúbulos:** Es una capa de microtúbulos (> 100 microtúbulos) localizada por debajo de la membrana plasmática que cubre casi por completo el cuerpo celular de *T. cruzi*, excepto en la región del bolsillo flagelar.

- b) **El cuerpo basal:** Es el único centro organizador de microtúbulos (MTOC, siglas en inglés) reconocible en el parásito. Es responsable de la nucleación de los microtúbulos del axonema flagelar.
- c) **El flagelo:** El flagelo de *T. cruzi* presenta una estructura básica de los flagelos, mostrando un patrón de microtúbulos del axonema de 9+2. El axonema es el motor mecano-químico de la célula. En *T. cruzi*, la forma celular y la morfogénesis, el movimiento celular (que ocurre a través del flagelo), la citocinesis y el posicionamiento y movimiento de organelos son esencialmente dependientes de los microtúbulos (Robinson *et al.*, 1995; Kohl *et al.*, 2003). Además del axonema microtubular, el flagelo contiene una estructura llamada **cuerpo o bastón paraflagelar, o estructura paraxial**, una red tridimensional de fibras altamente organizada, que se localiza paralelo al axonema a lo largo del flagelo, que se sugiere tiene también un papel en el movimiento flagelar.

Una estructura particular de *T. cruzi* es el **cinetoplasto**. *T. cruzi* presenta una sola mitocondria cuyo ADN se encuentra condensado en una región bien definida de ésta. El cinetoplasto corresponde a esa condensación de ADN, y éste se encuentra formando una estructura redonda o en forma de bastón cerca de la base del flagelo (la morfología del cinetoplasto varía de acuerdo al estado de desarrollo). El ADN del cinetoplasto corresponde al ~ 30 % del ADN celular total. Está formado por 20,000 a 30,000 minicírculos de ~ 0.8 a 2.5 kb y 20 a 50 maxicírculos de ~ 22 kb estrechamente asociados con una longitud de 6 a 11 μm , los cuales corresponden al ADN mitocondrial presente en todos los eucariontes. Los minicírculos son muy heterogéneos en cuanto a secuencia, y codifican para pequeños ARNs guía que controlan la especificidad de los procesos de edición de ARNm originados de los maxicírculos.

Otras estructuras celulares únicas en este organismo son **el glicosoma, el acidocalcisoma y el reservosoma**. El glicosoma es un organelo redondo, con un diámetro de 0.3 μm , o alargado hasta de 2.8 μm . Es un tipo peroxisoma con catalasa y con enzimas de la oxidación de aminoácidos y lípidos; también concentra y compartimentaliza a la vía de glicólisis, aumentando la eficiencia de este proceso. Por otro lado, el acidocalcisoma es un organelo ácido, con concentraciones de Ca^{2+} y polifosfatos; su membrana contiene muchos intercambiadores de iones (por ejemplo,

H⁺ATPasas, Ca²⁺ATPasas) y una pirofosfatasa. Se piensa que el acidocalcisoma funciona en el almacenamiento y regulación del Ca²⁺; además, la alta concentración de polifosfatos sugieren un papel adicional en el almacenamiento de energía. El reservosoma es un compartimento pre-lisosomal único del estadio epimastigote, en el cual se almacenan las macromoléculas ingeridas que emplearán durante la transformación de epimastigote a tripomastigote.

3.5 Vía de endocitosis, transporte vesicular y exocitosis o secreción en *T. cruzi*.

T. cruzi contiene dos estructuras celulares especializadas para la endocitosis, **el bolsillo flagelar** y **el citostoma**. El bolsillo flagelar es una invaginación amplia de la membrana plasmática de donde el flagelo emerge. Muy cerca de éste, se localiza el citostoma, también una invaginación de la membrana, que se extiende dentro del citoplasma como un túbulo estrecho. El bolsillo flagelar se encuentra en los tres estadios de *T. cruzi*, en cambio, el citostoma está presente en epimastigotes y amastigotes, pero no en tripomastigotes (Soares *et al.*, 1992). En los epimastigotes, donde está mejor caracterizado el proceso de endocitosis y el de transporte vesicular, se ha determinado que el principal sitio de endocitosis es el citostoma (Porto-Carreiro *et al.*, 2000), y que los nutrientes ingeridos (lípidos, proteínas, azúcares) a través de esta estructura, son transportados a lo largo de estructuras vesiculo-tubulares a los reservosomas, antes descritos, únicos del estadio epimastigote. Se conoce muy poco a cerca de los mecanismos de nutrición en amastigotes y tripomastigotes. En los amastigotes se ha reportado su capacidad de captar moléculas de la célula hospedero (por ejemplo, TGF-β) a través del citostoma y el bolsillo flagelar, que luego concentran en vesículas intracelulares (Waghbi *et al.*, 2005). También se ha reportado su capacidad de “tragar” vesículas con membrana a través del bolsillo flagelar (Meyer y De Souza, 1973). Por otro lado, se ha demostrado que varias proteínas importantes para la endocitosis no son expresadas en tripomastigotes, pero sí en amastigotes y epimastigotes, por lo que se piensa que en el tripomastigote la actividad de endocitosis podría ser mínima (Soares *et al.*, 1992; Mauricio de Mendonca *et al.*, 2000). Se ha sugerido que esta baja actividad de endocitosis en el tripomastigote se debe a que es una forma no proliferativa que no requieren la captación de nutrientes de *ново*. Son más escasos los datos referentes al proceso de exocitosis-secreción en *T. cruzi*. Al parecer, el bolsillo flagelar es el sitio con

mayor actividad de exocitosis en *T. cruzi* (Souto-Padrón *et al.*, 1990a). Los productos de secreción identificados en *T. cruzi* son proteínas integrales y periféricas de membrana las cuales son insertadas en el bolsillo flagelar, y posteriormente migran a otras regiones de la membrana plasmática, tal es el caso de la cistein proteínasa, cruzina o cruzipaína (Souto-Padrón *et al.*, 1990a). En el amastigote, además de la cistein proteínasa, se ha demostrado que otros antígenos como Ssp4, neuraminidasa, y epítopes conteniendo α -galactosil son liberados por exocitosis al bolsillo flagelar y posteriormente son distribuidos a través de toda la superficie celular o a otras regiones de ésta (Silva *et al.*, 1988; Souto-Padrón *et al.*, 1990 a, b, 1994). Finalmente, en un estudio proteómico en los diferentes estadios de *T. cruzi*, se detectó únicamente en los amastigotes un conjunto de proteínas involucradas en el tráfico vesicular (retículo endoplásmico - aparato de Golgi) - por ejemplo, rab1, sec23 y sec31 - sugiriendo un proceso más activo en este estadio (Atwood III *et al.*, 2005).

3.6 La tripanosomiasis americana.

La tripanosomiasis americana, presente a través de México, América Central y Sudamérica, es una parasitosis crónica conocida también como enfermedad de Chagas en honor al médico brasileño Carlos Chagas, descubridor del parásito flagelado (que posteriormente nombró *T. cruzi* en honor a su mentor Oswaldo Cruz), quien también demostró la relación de este parásito con la enfermedad (Andrade y Andrews, 2005, revisión).

La enfermedad de Chagas representa la más grave enfermedad parasitaria del continente Americano. La OMS estima que en el continente hay 16 - 18 millones de personas infectadas, 21,000 muertos reportados cada año, y más de 100 millones en riesgo de infección (<http://www.who.int/en/>). De los infectados, se ha estimado que del 25 % al 30 % la infección progresará irreversiblemente a patologías cardíacas, de esófago y de colon, provocando al cabo de los años, morbilidad y mortalidad considerables.

3.6.1 Transmisión. La transmisión natural, que es responsable del 80 % de las infecciones humanas, ocurre al contacto con las excreciones contaminadas del insecto

vector permitiendo la entrada de *T. cruzi* a través de lesiones en la piel, la mucosa o conjuntiva. La transmisión a través de transfusiones de sangre infectada puede ocurrir, y es la segunda causa principal de infección (5 - 20 % de los casos). También se ha reportado la transmisión congénita, con una incidencia de 2 - 10 % en los embarazos de madres infectadas. Finalmente, con una incidencia menor, se ha descrito la transmisión oral debida a la ingestión de alimentos contaminados con las heces de triatómino infectados.

3.6.2 Fases de la enfermedad de Chagas. Hay tres principales fases de la enfermedad de Chagas en el humano (Carlier *et al.*, 2003)

a) La fase aguda. Esta fase, que aparece justo después de la infección, afecta a niños y a adultos jóvenes, y es asintomática en los otros pacientes. Se caracteriza por una parasitemia alta, dado que ocurren múltiples ciclos de división celular del parásito, y una respuesta inflamatoria general intensa, resultado de la ruptura de células infectadas que liberan tripomastigotes y restos celulares. Los síntomas pueden incluir: lesiones en el portal de entrada del parásito en la transmisión natural, como el chagoma (nódulo cutáneo) cuando la entrada ha sido a través de la piel, y el signo de Romaña (edema unilateral perioftálmico) cuando la entrada fue a través de la conjuntiva; fiebre; dolor de cabeza; edema periférico; taquicardia persistente; sarpullido temporal; miocarditis aguda; meningoencefalitis; agrandamiento del hígado y del bazo; y linfadenopatía generalizada. La mortalidad en esta fase ocurre en < 5 % de los niños menores de 2 años, y se debe a la miocarditis aguda y/o la meningoencefalitis. Las manifestaciones de la fase aguda se resuelven espontáneamente en 3 a 8 semanas en el 90 % de los infectados, y entran a la fase intermedia asintomática. Un 5 % de los infectados presentan una progresión directa de la fase aguda a la fase crónica sintomática.

b) Fase intermedia o indeterminada. La infección aguda es seguida por una fase intermedia asintomática durante la cual el sistema inmune parece capaz de reducir a niveles bajos los tripomastigotes circulantes. Del 50 al 70 % de los pacientes en esta fase nunca desarrollan las lesiones crónicas de la enfermedad y permanecen en un estado

asintomático. Los 30 a 50 % de pacientes restantes desarrollan la fase crónica de 5 a 40 años después de la infección aguda.

c) Fase crónica. La fase crónica se caracteriza por el desarrollo de lesiones en órganos debidas a la inducción secuencial de la respuesta inflamatoria y a fibrosis. A nivel celular, los miocitos (por miocitólisis) y las células nerviosas (que producen la denervación autonómica) son principalmente afectados. A nivel de órganos, el corazón es el más afectado. Dos tercios de los pacientes de la fase crónica manifiestan problemas cardíacos como arritmias, falla cardíaca y tromboembolia. Al destruirse el sistema de conducción, los miocitos y los nervios cardíacos parasimpáticos, en conjunto con la aparición de un foco eléctrico arritmogénico en las áreas inflamatorias son el origen del síndrome arritmico. La hipertrofia de los miocitos sobrevivientes y la intensa fibrosis que reemplaza los miocitos destruidos predispone a la dilatación y a la falla cardíaca. La pared ventricular izquierda del corazón se adelgaza, lo cual produce la formación de un aneurisma apical (característico de la enfermedad de Chagas). La presencia del aneurisma favorece la formación de trombos, lo cual explica la común ocurrencia de tromboembolismo sistémico y pulmonar. Algunas veces (un tercio de los casos de fase crónica) pueden presentarse lesiones en el sistema digestivo debidas a la denervación intramural parasimpática; éstas lesiones están dispersas irregularmente y se ven afectados principalmente el esófago y el colon. La zona afectada puede presentar alteraciones peristálticas funcionales, puede estar dilatado (megaesófago o megacolon), o puede estar dilatada y agrandada (dolico megaesófago). No hay cura para las lesiones de la fase crónica, que resulta altamente incapacitante, y puede conducir finalmente a la muerte.

3.6.3 Diagnóstico. El diagnóstico de la infección aguda, cuando hay parasitemia detectable, consiste en identificar el parásito a través de pruebas de laboratorio (<http://www.who.int/en/>): 1) la examinación al microscopio de sangre no coagulada del paciente en un frote sanguíneo bajo la tinción de Giemsa; 2) el xenodiagnóstico, donde el paciente es intencionalmente picado por el insecto transmisor no contaminado y, a los 30 y 60 días después de la succión de la sangre, se examinan sus heces e intestinos bajo el microscopio para detectar tripomastigotes o epimastigotes del *T. cruzi*; 3) la inoculación de la sangre del enfermo en animales de laboratorio (como ratones) y la verificación de si

desarrollan la enfermedad aguda; 4) el crecimiento y la multiplicación de posibles parásitos presentes en la sangre en medios de cultivo especializados como por ejemplo, el medio LIT (triptosa de infusión de hígado). En las etapas intermedia y crónica de la enfermedad es más difícil el diagnóstico porque usualmente no tienen niveles detectables de parásitos en sangre. Para su diagnóstico se han desarrollado técnicas moleculares como la detección del ADN del parásito por PCR, y pruebas inmunológicas para detectar anticuerpos específicos contra el parásito en la sangre (fijación del complemento, hemoaglutinación indirecta, ELISA, aglutinación directa, y aglutinación de partículas), que también han funcionado para el diagnóstico de las fases intermedia y crónica de la enfermedad.

3.6.4 Tratamiento. Las principales drogas usadas para el tratamiento terapéutico son los nitrofuranos (nifurtimox; Bayer) y los nitroimidazoles (benznidazole; Roche), que actúan a través de la inducción de daño oxidativo o reductivo del parásito; sin embargo, ambas drogas son altamente mutagénicas y causan efectos secundarios importantes; además, su eficacia se limita a la fase aguda de la infección y ésta es altamente variable, por lo que aún existe controversia respecto a si los pacientes son realmente beneficiados por estos tratamientos (Croft *et al.*, 2005, revisión). Una variedad de drogas nuevas muy prometedoras están en desarrollo, por ejemplo, nuevos derivados de triazol, inhibidores de cruzipaína (una proteasa esencial específica de *T. cruzi*), N-alquil-bifosfonatos, inhibidores de la síntesis y metabolismo de tripanotion, etc. (Croft *et al.*, 2005, revisión). Por otro lado, no existe tratamiento para la forma crónica de la enfermedad, ni hay una vacuna, pero, en éste último caso, existe una gran cantidad de investigaciones realizadas en torno a los mecanismos de la infección que prometen el desarrollo de una vacuna.

3.6.5 Estrategias de control de la enfermedad de Chagas. En la actualidad, la estrategia de control más utilizada se basa en el control de la infestación de casas por triatóminos usando insecticidas, en conjunto con la promoción de mejoramiento de viviendas para controlar la transmisión natural del parásito. Por otro lado, la búsqueda sistemática de la sangre donada con análisis serológicos desarrollados, para eliminar la transmisión asociada a la transfusión. También, el tratamiento de casos agudos y casos en niños han contribuido a la disminución de la transmisión de la enfermedad. Estos

programas han recibido apoyo fuerte en casi toda Sudamérica, y ha probado ser altamente exitosa en reducir la prevalencia de la enfermedad (<http://www.who.int/en/>).

3.6.6 La enfermedad de Chagas en México. En México se ha encontrado que muchas de las especies de triatóminos del país se encuentran naturalmente infectadas con *T. cruzi*. Las especies de mayor relevancia epidemiológica corresponden a *T. barberi*, *T. dimidiata*, *T. phyllosoma*, *T. gerstaeckeri*, *T. longipennis*, *T. mazzotti*, *T. mexicana*, *T. pallidipennis* y *Rhodnius prolixus*. Sin embargo, la información de la prevalencia de la enfermedad de Chagas en el país es escasa. El dato más representativo corresponde al de la Encuesta Nacional de Seroprevalencia desarrollada de 1987 a 1989, el cual mostró una positividad media del 1.6 % a anticuerpos anti-*T. cruzi* para todo el territorio nacional, siendo los estados más infectados Chiapas, Oaxaca, Hidalgo, Veracruz, y Baja California Norte (Velasco-Castrejón *et al.*, 1992). Una prevalencia similar (1.5%) se observó en un estudio realizado en donadores de sangre en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (Guzmán-Bracho *et al.*, 1998). Según las estimaciones de la prevalencia de la enfermedad usando información poblacional un poco más reciente sugieren que el porcentaje de prevalencia de la enfermedad de Chagas en México se han mantenido (Guzmán-Bracho, 2001). En el período de 1991 al 2002, se han notificado un total de 209 casos agudos, 73 con manifestaciones tardías de la enfermedad y 733 casos indeterminados (Secretaría de Salud de México). Para enriquecer el conocimiento sobre la enfermedad de Chagas en México (a través del monitoreo de vectores y reservorios, así como de los casos humanos), y desarrollar estrategias y programas eficaces de control de la infección, se necesita un fuerte apoyo continuo por parte de las autoridades de salud y académico.

3.7 El citoesqueleto.

El citoesqueleto es único en los eucariontes (Alberts *et al.*, 2002). Como su nombre lo indica, es el esqueleto de la célula y ayuda a mantener la forma celular; su dinámica permite el movimiento celular (a través de estructuras como flagelos, cilios y lamelipodios), el transporte intracelular (movimiento de vesículas y organelos) y la división celular, entre otras funciones. El citoesqueleto está compuesto por tres principales tipos de filamentos: microfilamentos, microtúbulos, y filamentos intermediarios. Los microfilamentos son polímeros de actina, los microtúbulos lo son de tubulina, y los filamentos intermediarios son polímeros de proteínas fibrosas como la vimentina, la queratina y la desmina. A continuación se revisará el tema de la proteína actina, tema de este trabajo.

3.8 Actina.

3.8.1 Generalidades. Actina es una proteína compuesta de una cadena polipeptídica que típicamente consiste de 375 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 42 kDa. Esta proteína fue originalmente aislada de músculo estriado, en donde esta constituye el 20 % del total de proteínas celulares, por Straub *et al.* en 1942 (Universidad de Szeged en Hungría). Durante 20 años después de su inicial descubrimiento, actina fue descrita como un componente distintivo y único de las células musculares, sin embargo, a partir de los 1960's, empezaron a emerger reportes de la presencia de isoformas en muchas células no musculares. En los vertebrados se tienen identificadas seis isoformas de actina codificadas por una familia de genes y con una distribución tejido distintiva: 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 citoplásmica β y γ . En la actualidad actina es reconocida como una de las proteínas más conservadas, abundantes y versátiles de las células eucariontes. Actina ha sido identificada en las células de todos los organismos eucariontes, en muchos de los cuales representa del 5 al 10 % del total de proteína, y su secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre las especies: las actinas de fuentes más divergentes como las de los protozoarios, que tienen mayor parecido a la γ actina citoplásmica de vertebrados, aún comparten similitudes de 65 a 70 %. Esta conservación a través de la evolución, es explicada por la importancia de

actina en las células, en el sentido de que debe ser difícil cambiar aminoácidos sin afectar adversamente muchas de las interacciones proteína-proteína de actina, importantes para muchas tareas vitales para la célula - Ver más adelante función de actina - (Alberts *et al.*, 2002).

En años recientes, se han descrito actinas divergentes, que en conjunto con la actina conforman un grupo de diversas proteínas evolutivamente antiguas, que ahora se ha llamado familia de actina - Ver Cuadro 1 - (Alberts *et al.*, 2002).

| Cuadro 1. |
|--|
| La familia de Actina. La actina convencional y las actinas divergentes, las ARPs. |
| A principios de los 1990's, comenzaron a clonarse y caracterizarse genes distantemente relacionados al gen de la actina "convencional" (gen que codifica a la actina filamentososa) en diversos organismos. La secuencia de nucleótidos de estos genes son, en promedio, un 50 % idénticos a la actina convencional, y sus productos fueron nombrados como proteínas relacionadas a actina o ARPs (de las iniciales en inglés de "actin related protein"). En la actualidad, se sabe que la mayoría de las células eucariontes contienen variedad de ARPs. Algunas de estas ARPs tienen papeles bien caracterizados, por ejemplo, Arp2 y Arp3 en la polimerización de la actina convencional, Arp1 y Arp10 en la función motora de dineína, y Arp4, Arp5, Arp6, Arp7, Arp8 y Arp9 en el núcleo, particularmente en la remodelación de la cromatina. También, se han identificado Arps orfanas cuya función aun se desconoce. Con la disposición de las secuencias genómicas completas de varios organismos eucariontes, se han localizado otros genes que codifican nuevas proteínas relacionadas a actina, de las cuales será importante determinar si son funcionales (Goodson y Hawse, 2002). |

Los datos cristalográficos indican que actina es una proteína globular conformada por dos dominios conectados por una bisagra (Figura 3A). La molécula presenta una hendidura que forma sitios de unión tanto para un catión divalente (generalmente Mg^{2+} en las células) como para un nucleótido ATP o ADP (Figura 3A). Los dos dominios de actina, llamados originalmente como grande y pequeño (aunque ahora se sabe que tienen casi el mismo tamaño) son divididos en subdominios (Figuras 3A y 4). El dominio pequeño está compuesto de los subdominios 1 (que en la secuencia primaria de la α actina de conejo corresponden a los residuos aminoácidos, aa, 1-32, 70-144 y 338-375) y 2 (33-69 aa), mientras que el dominio grande está compuesto de los subdominios 3 (145-180 aa y 270-337 aa) y 4 (181-269 aa). Los subdominios 1b y 3a, localizados en el interior de la molécula actina, conforman el bolsillo hidrofóbico, asociado a la unión al nucleótido y al catión.

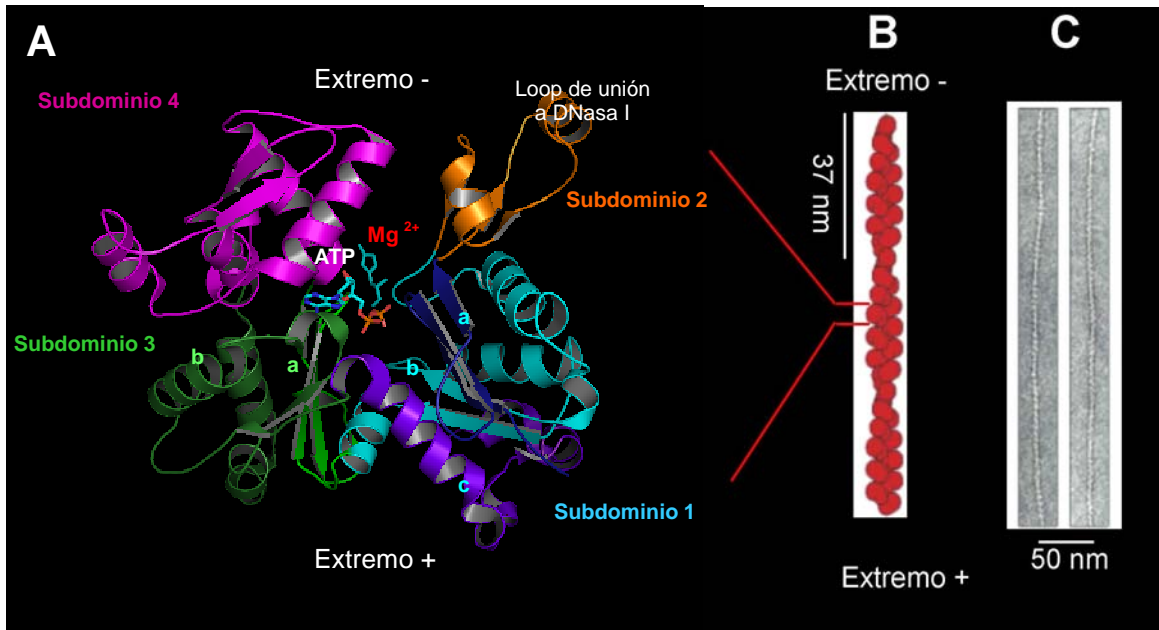


Figura 3. A) Estructura tridimensional de α actina de conejo. B) Dibujo de varias moléculas de actina constituyendo un microfilamento. Los microfilamentos son fibras flexibles de aproximadamente 7 nm de diámetro y varios micrómetros de longitud. Cada microfilamento está constituido por 2 hebras polímeros de actina, que se enrollan para formar una estructura helicoidal doble. En el microfilamento, cada 37 nm o 13 subunidades, las hebras se entrecruzan. La actina puede polimerizar en ambos extremos, sin embargo, la velocidad es más rápida en el llamado (por convención) extremo positivo (+) que en el extremo negativo (-). C) Microfilamentos vistos por medio del microscopio electrónico. Las figuras B y C fueron tomadas de Alberts *et al.*, 2002.



Figura 4. Distribución de los subdominios en la secuencia primaria de la proteína α actina de conejo.

Los dominios restantes, que están principalmente expuestos en la superficie de la proteína, contienen regiones importantes para la polimerización de actina, siendo relevantes, el *loop* de DNasa I (38-52 aa), el *loop* H (262-274 aa) que incluye un tapón hidrofóbico de 4 residuos, y el extremo carboxilo terminal de la proteína. En la tabla 1 se indican algunos de los residuos que se ha demostrado son importantes en la interacción intermolecular durante la polimerización, en la unión a ATP y otras moléculas (Dos Remedios *et al.*, 2002).

Actina presenta un número pequeño de modificaciones covalentes post-traduccionales. En la mayoría de las células, las moléculas de actina son modificadas por la acetilación de los residuos N-terminales (Abe *et al.*, 2000), y la metilación de una de sus histidinas, la H73 (Yao *et al.*, 1999). Estas modificaciones conducen a cambios estructurales que finalmente repercuten en la función de actina. Por ejemplo, la acetilación del extremo N-terminal modifica la interacción con proteínas en ésta región, y la metilación H73 es importante para la correcta interacción con el nucleótido. Por otro lado, se ha observado que en *Dictyostelium discoideum* la fosforilación extensiva de tirosinas de actina ocurre en respuesta a estrés químico (Liu *et al.*, 2006), y en *Physarum* actina es fosforilada en T203 bajo estrés por deshidratación (Gettemans *et al.*, 1992); en ambos casos, la fosforilación afecta la polimerización de actina, por lo tanto, originando cambios en la forma celular. También, se ha reportado que en la planta *Mimosa pudica* actina es fosforilada en tirosinas antes del movimiento foliar inducidos por contacto (característico de ésta planta) y desfosforilada después; al parecer, el estado fosforilado impide la fragmentación de filamentos de actina requeridos para tal movimiento (Kameyama *et al.*, 2000; Kanzawa *et al.*, 2006). En células de mamíferos no hay evidencia de fosforilación de tirosinas, aún exponiéndolas a estrés (Liu *et al.*, 2007).

Tabla 1. Residuos involucrados en varias interacciones y funciones de actina:

| Función | Sitios de unión |
|-----------------------------|---|
| Polimerización | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Loop</i> de unión a DNasa I (residuos 38–52), el extremo C-terminal. Kim y Reisler, 1996. • <i>Loop</i> H (residuos 262–274). Feng, 1997. • Algunas interacciones intermoleculares entre las actinas: H40/E167, Q41/C374, S265/C374, y Q41/S265. Kim <i>et al.</i>, 2000. • 2-5, 40-50, 61-64, 89-100, 110-112, 130-131, 166-173, 195-197, 202-205, 243-247, 266-269, 285-289, 322-325, 357-360, y 375. Dos Remedios <i>et al.</i>, 2002. |
| Unión a ATP | D13, S16, G17, L18, K20, Q139, D156, D159, G160, V161, K215, E216, G304, T305, M307, Y308 y K338. Otterbein <i>et al.</i> , 2001. |
| Unión a ABPs: | |
| DNasa I | <i>Loop</i> de unión a DNasa I (residuos 38–52). Residuos 39-46, 50, 53, 60-64, 68, 69, 202-204 y 207. Dos Remedios <i>et al.</i> , 2002. |
| ADF/COFILINA | 1-12, 25, 147, 167, 288, 292, 328, 334, 341, 344, 345, 348, y 357-375. Dos Remedios <i>et al.</i> , 2002. |
| Profilina | 113,166, 167, 169, 171-173, 284, 286-288, 290, 354, 361, 364, 369, 371-373 y 375. Dos Remedios <i>et al.</i> , 2002. |
| Gelsolina | 1-18, 112-117, 144, 146, 148, 167, 169, 285-375, 334, 350, 351, 354, 356-375, 374 y 375. Dos Remedios <i>et al.</i> , 2002 |
| Timosina | 1-4, 41, 154, 155, 167. Dos Remedios <i>et al.</i> , 2002. |
| CapZ | 338-348 y 360-372. Dos Remedios <i>et al.</i> , 2002. |
| Complejo ARP2/3 | Subdominios 2 y 4. Dos Remedios <i>et al.</i> , 2002. |
| Unión a Miosina II | La region N- terminal es importante para la función actino-miosina. Residuos de unión a miosina II (2, 24, 25, 40, 42, 144–148, y 341–353). |
| Unión a drogas: | |
| Unión a Faloidina | G158, R177 y D179. Belmont, 1999. |
| Unión a Latrunculina | R210, D211, K213, E214, K215, D157, R183 y D184. Ayscough <i>et al.</i> , 1997; Belmont <i>et al.</i> , 1999. |

La función principal de actina es formar filamentos, también conocidos como microfilamentos o actina F - Figura 3B -. A la forma monomérica de la proteína se le llama 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 2 hebras de polímeros de actina, que se enrollan para formar una estructura helicoidal doble. En el microfilamento, cada 37 nm o 13 subunidades, las hebras se entrecruzan. 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. En el microfilamento cada monómero de actina es rotado 166 °, lo cual le da la apariencia de doble hélice. Debido a que todos los monómeros de actina están orientados en la misma dirección, los filamentos tienen una polaridad diferente en sus extremos: más y menos. Esta polaridad se distingue fácilmente con la “decoración” con fragmentos S1 de miosina: los fragmentos S1 de miosina se unen a las moléculas de actina en un filamento, en una manera estéricamente precisa, formando una serie de proyecciones laterales dirigidas en una dirección; cuando se observan en microscopio electrónico, estas proyecciones aparecen como flechas, permitiendo distinguir los extremos del filamento. A partir de este ensayo, se nombraron extremos puntuado y barbado a los extremos más y menos, respectivamente, del filamento. La polaridad del microfilamento es importante para su ensamblaje.

In vitro, actina se polimeriza espontáneamente. El primer paso en la polimerización de actina, llamada nucleación, es la formación de un agregado de tres monómeros de actina. Los microfilamentos pueden crecer por la adición reversible de monómeros en ambos extremos, sin embargo, el extremo más crece cinco veces más rápido que el extremo menos. El ATP contenido en los monómeros de actina es hidrolizado a ADP después del ensamblaje del filamento. El ATP no es necesario para la polimerización, sin embargo, los monómeros con ATP se unen más fácilmente al filamento que aquellos que contienen ADP. Como se verá adelante, tanto la unión como la hidrólisis del ATP tienen un papel importante en la regulación del ensamblaje y la dinámica de los filamentos de actina

Existe un equilibrio entre los monómeros y los filamentos de actina dependiente de la concentración de los monómeros libres: la velocidad con la cual un monómero se incorpora al filamento es proporcional a su concentración, por lo tanto, hay una

concentración crítica de monómeros con la cual la velocidad de su polimerización iguala la velocidad de disociación; a ésta concentración crítica, los monómeros y filamentos están en equilibrio.

Como se mencionó anteriormente, los extremos de los microfilamentos crecen a diferentes velocidades. Debido a que actina-ATP se disocia menos rápido que actina-ADP, esto resulta en una diferencia en la concentración crítica de monómeros necesaria para la polimerización en los dos extremos. Esta diferencia produce el fenómeno de “treadmilling” (“rueda de carreta” o “movimiento noria”) que demuestra el comportamiento de la dinámica de los filamentos de actina. Para que este sistema se encuentre en un estado estacionario, la concentración de monómeros libres debe ser intermedio entre las concentraciones críticas requeridas para la polimerización en los extremos más y menos del filamento. Bajo estas condiciones, hay una pérdida neta de monómeros provenientes del extremo menos, que está balanceado por una adición neta al extremo más. El fenómeno de “treadmilling” requiere ATP, con actina-ATP polimerizándose en el extremo más, mientras actina-ADP se disocia del extremo menos. A pesar de que se desconoce el papel de este fenómeno en la célula, este podría reflejar la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de los microfilamentos requeridos para el movimiento y cambio de la forma celulares.

En la célula, las proteínas de unión a actina o ABPs (de las siglas en inglés de Actin Binding Proteins) regulan el tamaño de la poza de actina libre, la nucleación, el ensamblaje-desensamblaje de la actina en filamentos, y la organización de microfilamentos en estructuras más complejas como haces y redes de actina (Dos Remedios *et al.*, 2002). Se han identificado más de 70 ABPs, algunas afectan los monómeros controlando su secuestro o por el intercambio de nucleótido; otros controlan la formación y la estabilidad de filamentos regulando el “capping”, la nucleación, el entrecruzamiento, la formación de haces, y el corte (“severing”). Consultar tabla 2. La presencia de reguladores (ABPs) son los que determinan qué tipo de estructuras y de actina se formarán.

Tabla 2. Proteínas de unión a actina (ABPs Actin Binding Proteins) y sus funciones.

| Función: | Ejemplos de ABPs: | |
|-----------------------|---|--|
| Nucleación | | <ul style="list-style-type: none"> • Complejo ARP 2/3: Genera núcleos de actina del lado de filamentos existentes. Se une a G-actina para generar un trímero estable y un núcleo para el crecimiento del filamento. Se une al extremo menos para asegurar el crecimiento al extremo más • Forminas: El dímero del dominio de formina homología 2 (FH2) se flexiona para acomodar la adición continua de monómeros de actina al extremo más del filamento. En levadura, los cables largos de actina se requieren para la polaridad celular se generan por nucleación de forminas. |
| | Regulación del crecimiento, estabilidad y desensamblaje de F-actina | a) "Cappers" |
| b) Despolimerizadoras | | <ul style="list-style-type: none"> • ADF Actin Depolymerizing Factor (ADF) / Cofilina: Proteína ubicua, altamente conservada. Se une a ADP-F-actina y promueve la disociación de ADP-actina del extremo menos del filamento. ADF/cofilina también se asocia con AIP-1 (actin interacting protein), aumentando la actividad despolimerizante de la cofilina. Por otro lado, también promueve el capping del extremo más. |

| | | |
|---|--|---|
| Regulación del crecimiento, estabilidad y desensamblaje de F-actina | c) Prevención de la polimerización | <ul style="list-style-type: none"> • Tropomiosina: Se une a lo largo del filamento y lo estabiliza en contra de la despolimerización espontánea. Tiene efecto protector contra la despolimerización mediada por la gelsolina y la ADF/cofilina. En músculo estriado, junto a las troponinas regula la interacción de miosina con actina. • Nebulina: Proteína larga con numerosos sitios de baja afinidad para actina, que actúan juntos para promover, estabilizar y determinar la longitud de los filamentos delgados en el músculo estriado. |
| | d) Proteínas que responden a redes de señalización modificando la organización de F-actina | <ul style="list-style-type: none"> • Proteínas con motivos de unión a poli-prolina: VASP y la vinculina. • Proteínas con motivos poli-prolina, que reclutan componentes de la maquinaria de polimerización de actina: profilina. • Proteínas con varios dominios SH3 (que reconocen secuencias ricas en prolina) que las asocian a tráfico de membrana (p.e., Abp1) y con complejos de adhesión (p.e., cortactina). |
| Proteínas de unión a monómeros | | <ul style="list-style-type: none"> • Twinfilina, ADF/cofilina: Se unen a ADP-actina tan rápido como es liberada de los filamentos. • Profilina y CAP: Facilitan el intercambio de ADP por ATP. • Twinfilina, Srv/CAP, profilina, verprolina/WIP y WASP: Facilitan nuevas rondas de polimerización. |
| Proteínas secuestradoras de monómeros | | <ul style="list-style-type: none"> • Timosina: Se une a los dos extremos de actina monomérica previniendo la incorporación a los filamentos. |
| Proteínas que regulan las estructuras de F-actina de alto orden: | a) "Actin-bundling protein"(proteínas para la formación de haces) | <ul style="list-style-type: none"> • Haces relajados: alpha-actinina, fibras estriadas de actina. • Haces estrechos: fimbrina en las microvellocidades. |

| | | |
|---|--|--|
| | b) “Actin-crosslinking proteins” (proteínas para la formación de redes) | <ul style="list-style-type: none"> • Arreglos perpendiculares: dímero de filamina o complejos tetraméricos de espectrina. • Mallas densas: monómeros de transgelina. |
| ABPs que interactúan con actina en la mecánica celular | a) Proteínas motoras | <ul style="list-style-type: none"> • Miosinas: <p>Motores moleculares dependientes de actina que producen movimiento y fuerza a través de la hidrólisis de ATP. La miosina se mueve a través de la actina. Hay 20 diferentes miosinas con funciones distintas. Todas usan a la actina como anclaje para mover membranas, vesículas, filamentos de actina u otras proteínas, principalmente del extremo más al menos.</p> |
| | b) Proteínas de anclaje a la membrana: | <ul style="list-style-type: none"> • Distrofina: <p>Es una proteína del complejo distrofina-glicoproteínas que liga el citoesqueleto de la fibra muscular a la matriz extracelular, a través de la membrana celular.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Utropina: <p>Proteína relacionada a la distrofina.</p> |
| | c) Proteínas conectores entre actina y otros elementos del citoesqueleto: | <ul style="list-style-type: none"> • Talina: <p>Unen el citoesqueleto de actina a los receptores de adhesión celular distroglicanos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vinculina: <p>Unen el citoesqueleto de actina a los receptores de adhesión celular como los integrinas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anexinas: <p>Interactúan directamente con la membrana y con actina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Plectina: <p>Une actina a microtúbulos o a filamentos intermedios.</p> |

3.8.2 ¿Cómo se estudia actina en las células? La identificación y el análisis de la localización subcelular de actina y las estructuras formadas por ésta en diversos tipos celulares se ha realizado usando la microscopía electrónica de transmisión, la inmunomicroscopías electrónica y de fluorescencia y técnicas bioquímicas como la electroforesis, uni y bi-dimensional y el inmunoblotting usando anticuerpos dirigidos contra la proteína, o sobre-expresando proteínas de fusión GFP (de sus siglas en inglés Green Fluorescent Protein)-actina en las células estudiadas (Small *et al.*, 1999). Se realizan estudios bioquímicos para separar la actina monomérica (incluso purificarla) de la polimerizada en los extractos celulares, se realizan ensayos “spin-down” que se basa en la sedimentación diferencial -este ensayo tiene la desventaja de que a veces puede ser destructivo y que los oligos pequeños no sedimentan- (Harris *et al.*, 1982), y los ensayos de afinidad a la DNasa I (Cuadro 2). Por otro lado, para el estudio de la dinámica del citoesqueleto de actina en las células, se han empleado una serie de agentes o drogas con efectos estabilizantes o desestabilizantes de los microfilamentos de actina (Fenteany y Zhu, 2003). Consultar Tabla 3. También, la mutación o delección del gen de actina, por ejemplo, insertando genes de resistencia a antibióticos, utilizando el sistema de RNA de interferencia para “silenciar genes” se han empleado para entender el papel de ésta proteína en el ciclo de vida de diferentes células (ejemplo de este tipo de estudios se pueden consultar en: Drubin, 1990; Williams, 2006; Dunn, 2007; Shering *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; García-Salcedo *et al.*, 2004)

| Cuadro 2. |
|---|
| La desoxiribonucleasa pancreática bovina I o DNasa I. |
| <p>La DNasa I es una ABP de 33 kDa que hidroliza el ADN y que se une con alta afinidad a actina G (en la superficie del subdominio 2) y al extremo puntuado de actina F (Podolski y Steck, 1988). En algunas células se le ha encontrado interactuando fuertemente con actina, pero aún se desconoce la importancia biológica de esta asociación (Malickablaszkiewicz y Roth, 1983). La DNasa I ha sido una herramienta muy útil para el estudio de actina: por ejemplo, el ensayo de inhibición de DNasa I mide los niveles de actina no polimerizada aprovechando que la actividad de endonucleasa de la DNasa I es inhibida por la unión de la DNasa I con actina monomérica; la DNasa I se utilizó para prevenir la polimerización de actina en solución para los estudios de obtención de la estructura cristalográfica de actina G (Kabsch <i>et al.</i>, 1990); también, se ha utilizado mucho para purificar actinas de diversas fuentes por cromatografía de afinidad (Schafer <i>et al.</i>, 1998).</p> |

Tabla 3. Agentes más empleados que afectan el citoesqueleto de actina:

| Agente: | Efecto: |
|--------------------|--|
| Citocalasina B, D | Rompe el citoesqueleto de actina al unirse a los filamentos de actina y bloquear la polimerización y la elongación de actina. |
| Latrunculina A y B | Rompe el citoesqueleto de actina al secuestrar actina G de la polimerización, conduciendo a un aumento de actina G, y disminuyendo F actina. |
| Faloidina | Estabiliza a F-actina uniéndose específicamente a la interfase entre los monómeros de actina que se encuentran formando un filamento. La faloidina marcada con el fluorocromo rodamina es muy empleada para localizar microfilamentos en Microscopía de fluorescencia. |
| Jasplakinolide | Estabiliza los filamentos de actina al unirse a F-actina, compite con faloidina. |

Nota: A pesar de ser las citocalasinas una de las drogas más empleadas, no hay datos de posibles residuos de unión a actina. Para Faloidina y Latrunculina se han reportado algunos residuos involucrados en la unión (Tabla 1). Jasplakinolide se sabe que compite con faloidina, indicando sitios de unión comunes.

3.8.3 Funciones arquetípicas de actina y su papel en protozoarios. En las células de metazoarios los filamentos de actina pueden ensamblarse en una gran variedad de estructuras celulares complejas que tienen funciones específicas (Figura 5). Se aprecia que el citoesqueleto de actina interviene en diversos procesos celulares: en el movimiento celular y la remodelación de la superficie celular; media los cambios de la forma celular durante la mitosis; es esencial para varias actividades contráctiles, como la contracción muscular o la separación de las células hija por el anillo contráctil durante la citocinesis; controla las interacciones célula-célula y célula-substrato junto a moléculas de adhesión; y participa en la señalización transmembranal, en la endocitosis, en la secreción o exocitosis, en la segregación de cromosomas y en el transporte de organelos (Schmidt y Hall, 1998, revisión). Los filamentos de actina son también un componente esencial de numerosas estructuras especializadas en los eucariontes superiores, por ejemplo en las quetas (cerdas o pelos sensoriales) de *Drosophila* y los estereocilios de células sensoriales (retina, oído interno, neuronas olfativas). En plantas, el ensamblaje de los filamentos de actina contribuye al desarrollo de la forma celular, de los tricomas de plantas, del crecimiento de las puntas de las raíces y de los tubos de polen, también es importante para el movimiento de organelos (Higaki *et al.*, 2007). Recientemente se han demostrado funciones para actina en su forma monomérica en el núcleo: actina es miembro de complejos remodeladores de la cromatina; actina es constituyente de los complejos transcripcionales de las ARN polimerasas Pol I, Pol II y Pol III; actina parece

tener un papel en el transporte de ARNs y RNPs (ribonucleoproteínas), y un papel estructural de los complejos nucleares (Rubenstein y Wen, 2005, revisión).

En *S. cerevisiae*, las funciones del citoesqueleto de actina son la selección del sitio de gemación, el dirigir el crecimiento de la célula hija durante la gemación, la división nuclear, la citocinesis, la endocitosis, la posición y movimiento de organelos, y los cambios en la forma celular como respuesta a estímulos externos (Schmidt y Hall, 1998, revisión).

Algunas de las funciones del citoesqueleto de actina en metazoarios y levadura han sido identificadas en eucariontes de divergencia temprana, en los protozoarios (sarcodinos - amibas, tricomonadidos -, ciliados, esporozoarios – apicomplexos -, flagelados, hongos limosos - protistas fungosos -, dinoflagelados, euglenoides y algas doradas). Por ejemplo, en amiba (*Entamoeba*, *Amoeba*, *Naegleria*), su desplazamiento ocurre a través del ensamblaje y desensamblaje de pseudópodos en el extremo frontal de la célula. Se han descrito en *Entamoeba histolytica* estructuras ricas en actina que facilitan la adhesión (contactos focales) a estructuras de las células blanco (Vázquez *et al.*, 1995). También se reporta que la fagocitosis en la especie *Naegleria* involucra una estructura especializada llamada amoebostoma que es rica en filamentos de actina (Sussman *et al.*, 1984). Por otro lado, en el ciliados (*Dictyostelium*, *Tetrahymena*), el sistema de actina forma una red asociada a la membrana que sirve para múltiples funciones, estructurar la corteza celular, movimiento celular controlado por quimio-atrayentes, en la corriente citoplásmica, en el movimiento ciliar, en la fagocitosis, en la macropinocitosis, en el transporte intracelular, y en la citocinesis (Bretschneider, 2002; Williams, 2006). En *Physarum*, un hongo limoso, actina además de asociarse a la locomoción, ésta tiene un papel importante en la corriente citoplásmica, muy vigorosa en ésta célula (Nakamura y Kohama, 1999). En el tricomonadido *T. vaginalis*, actina parece ser un componente importante de las estructuras asociadas a la adhesión *in vitro* (Brugerolle, 1996), y la fagocitosis (Pereira-Neves y Benchimol, 2007). En las diatomeas, microalgas doradas, el movimiento de “gliding” se basa en el citoesqueleto de actina (Poulsen *et al.*, 1999). En *Euglena* (euglenoide), la localización de actina coincidió con la membrana plasmática sugiriendo participación en la transformación celular (Mermelstein *et al.*, 1998). En los dinoflagelados *Prorocentrum micans* y *Cryptothecodinium cohnii* actina se localizó en el citoplasma y en el núcleo sugiriendo varias funciones en estos

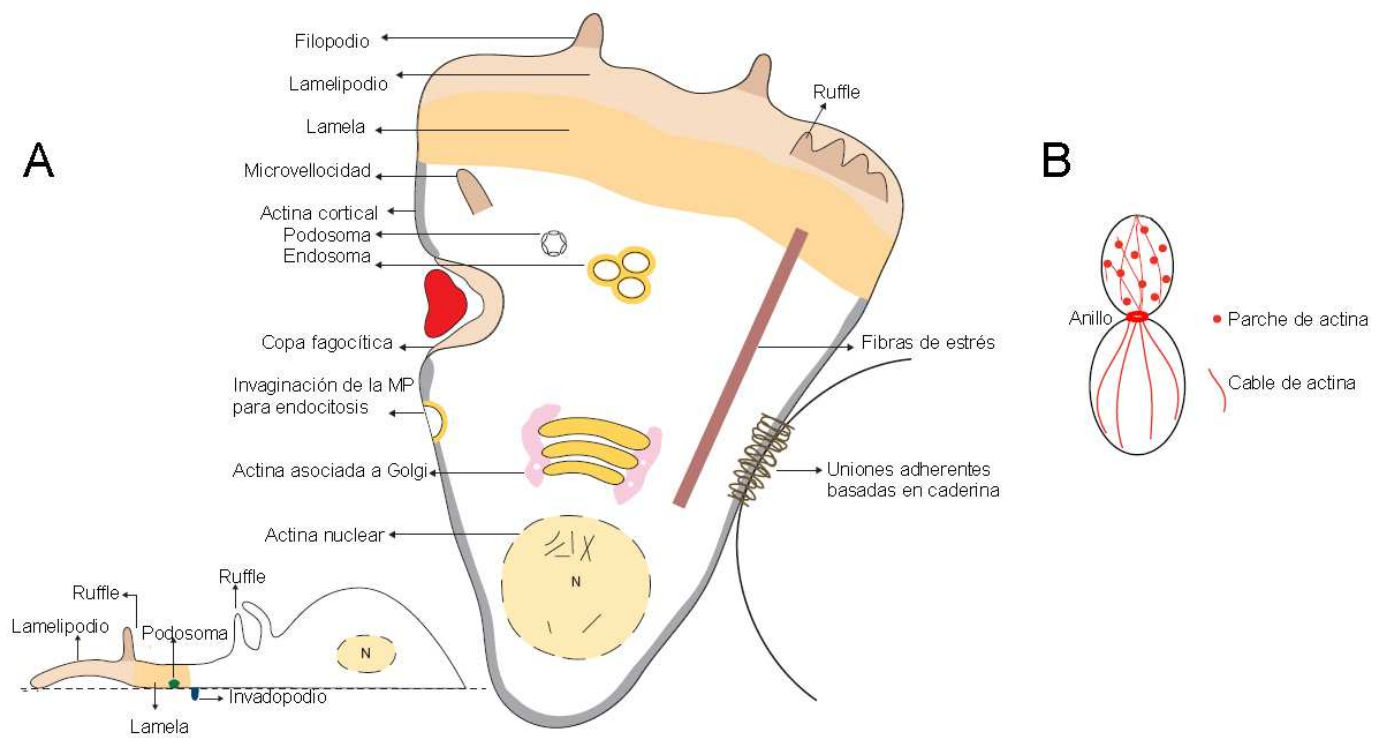


Figura 5. Estructuras celulares que contienen filamentos de actina en células de metazoarios (A) y en levadura (B).

A continuación se describen algunas de éstas estructuras. 1) Uniones célula-célula (uniones adherentes): en las células epiteliales, una banda circunferencial de filamentos de actina provee el soporte estructural para las uniones célula-célula (uniones adherentes). 2) Filopodios y microvelocidades: son protrusiones estrechas (menos de 200 nm de diámetro), formados por haces paralelos de 10 a 30 filamentos de actina que corren a lo largo de la protrusión y que tienen orientado su extremo barbado hacia la membrana. Los filopodios son protrusiones tipo “dedo” adheridas a un substrato o a otra célula, se observan en el borde principal (leading edge) de muchas células motiles, como fibroblastos y conos de nervios en crecimiento, dendritas neuronales. Por otro lado, la microvelocidad, que no se adhiere, se encuentran en la superficie luminal de las células epiteliales del intestino y del riñón (funcionan para aumentar el área de la superficie de absorción), y en linfocitos (segrega proteínas de superficie celulares). 3) “Ruffles”: son protrusiones transitorias de membrana de forma laminar, están asociados al “arrastre” celular, y “ruffles” a la endocitosis por receptores y a la macropinocitosis. 4) Podosomas: Estructuras conteniendo integrinas en la superficie celular basal, que tienen un centro rico en actina rodeado por un anillo de varias proteínas asociadas a actina. Se observan en macrófagos, células dendríticas y osteoclastos. 5) Lamelipodios: son prolongaciones transitorias de la membrana celular, con una estructura es ancha y su forma laminar, que contienen filamentos de actina altamente ramificados y entrecruzados. 6) Invadopodios: protrusiones de membrana de células tumorales invasoras que se extienden en la matriz extracelular y median la digestión celular y la invasión a través de la matriz. 7) Actina cortical: los haces paralelos y las redes ortogonales representan los extremos del arreglo altamente complejo de filamentos de actina observables en la superficie celular (corteza celular). Dan soporte y forma celular. 8) Actina asociada a Golgi: los microfilamentos de actina controlan la morfología y la posición subcelular del complejo de Golgi. 9) Fibras de estrés. Son haces cortos de actina contráctiles (gracias a su interacción con miosinas), que son esenciales para la adhesión celular al substrato y para morfogénesis, especialmente durante la migración celular. 10) En la levadura, actina se organiza en dos principales estructuras durante el crecimiento de la gema, cables (haces de actina) y parches (discos de actina), importantes por ejemplo, para la endocitosis; y en una tercera estructura, el anillo citoquinético, formado durante la división celular. Figuras modificadas de: Chhabra y Higgs (2007) y Lew (2002).

compartimentos, por ejemplo, en el núcleo se sugiere que se encuentra organizando los cromosomas (Soyer-Gobillard *et al.*, 1996). En *Giardia*, se ha sugerido un papel del citoesqueleto de actina en la endocitosis mediada por clatrina (Hernández *et al.*, 2007). Finalmente, en los protozoarios apicomplexos *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum*, el citoesqueleto de actina es importante para la locomoción celular del apicomplejo (“gliding”) y la invasión celular. Interesantemente, en estos organismos actina, que generalmente se encuentra en su forma monomérica (no se habían podido visualizar microfilamentos de actina), el tratamiento con la droga estabilizadora de microfilamentos Jasplakinolide (Bubbs *et al.*, 2000) permitió observar una protrusión apical conformada por microfilamentos, transitoria e importante para la invasión de las células que parasitan estos organismos (Shaw y Tilney, 1999; Mizuno *et al.*, 2002).

3.8.4 Movimiento dependiente de actina. Los filamentos de actina contribuyen al movimiento en las células proveyendo fuerza locomotora directa a través de la formación de filamentos o asociándose a las proteínas motoras miosinas (Mermall *et al.*, 1998).

Las miosinas son una súper-familia de proteínas que se mueven a lo largo de los filamentos de actina mientras hidrolizan ATP. Se han descrito al menos 20 clases. No todas las clases se encuentran en un organismo, hay miosinas específicas de ciertos organismos. Todas las miosinas están compuestas de tres dominios funcionales: la cabeza, que está altamente conservada, es la región motora (hidrólisis de ATP) y de unión a actina; el cuello, que contiene motivos IQ que unen a cadenas ligeras como calmodulina; y la cola, extremadamente variable en la longitud de secuencia, en la composición de dominios y organización, ésta es responsable de la dimerización, la interacción con otras proteínas y la unión a cargo.

Las miosinas de clase II fueron las primeras en describirse, y son las más estudiadas. Estas incluyen las miosinas de músculo, que son las responsables de la contracción del músculo sarcomérico, y miosinas similares de células no musculares, en donde por ejemplo, asisten (formando estructuras contráctiles con los filamentos de actina) la citocinesis, la unión célula-célula, la retracción de lamelipodios, la interacción célula-substrato, y la gemación de vesículas a partir de la red trans-Golgi. Otras clases de miosinas más estudiadas son las miosinas I, V y VI. Miosina I, que no forma dímeros, es

importante para la interacción membrana-actina y para mover membranas a través de microfilamentos. Está implicada en el crecimiento y desarrollo celular, en la locomoción celular, en el transporte vesicular, en la endocitosis y en la exocitosis. La miosina V es un componente fundamental del transporte de organelos y vesículas. Algunos de sus cargos son los melanosomas, vesículas sinápticas, vacuolas y ARN mensajero. Miosina VI tiene funciones en la locomoción celular, en la endocitosis y mantiene la estructura de las microvellocidades.

3.8.5 Señalización. Las proteínas pequeñas de unión a GTP de la familia Rho (Rho, Rac y Cdc42) son los principales reguladores de las vías de señalización que conectan factores extracelulares (por ejemplo, factores de crecimiento y hormonas que se unen a sus receptores en la célula) al ensamblaje de estructuras basadas en actina. Rho, Rac y Cdc42 fueron descubiertas en los 1990's por su habilidad única para inducir estructuras específicas de microfilamentos de actina en fibroblastos: Rho regula la formación de filamentos de actino-miosina para formar fibras de estrés y focos de adhesión, Rac para formar lamelipodios y Cdc42 para filopodios (Hall, 1998, revisión). Con los años, se ha acumulado evidencia que demuestra que en todas las células eucariontes, las Rho GTPasas están involucradas en la mayoría de los procesos dependientes de actina, como aquellos asociados a la migración celular, a la adhesión, a la morfogénesis, a la guía del axón, y la fagocitosis (Kaibuchi *et al.*, 1999; Chimini y Chavrier, 2000; Luo, 2000). Para mediar sus efectos en el citoesqueleto de actina, varias proteínas se unen a Rho, Rac y Cdc42 en una manera dependiente de GTP, como la serina/treonina cinasas, la Rho-cinasa, y ROK α y ROK β -de las siglas en inglés de "RhoA-binding kinase α , β "- (Hall, 1998, revisión). La unión de las Rho GTPasas a estas cinasas eleva su actividad. Así, la Rho-cinasa puede fosforilar la cadena ligera de las miosinas, aumentando la unión de miosinas a los filamentos de actina y subsecuentemente la formación de las fibras de estrés. Otro blanco de Rho es el de la fosfatidil inositol 4-fosfatasa 5-cinasa y p140mDia que regulan la polimerización de actina. Un blanco de Rac es POR1 que media la formación de "ruffles" de membrana. Por otro lado, WASP y su relacionada N-WASP son activadas por Cdc42 y el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, esto fomenta el reclutamiento del complejo ARP2/3 para la formación de filopodios. Para la formación de lamelipodios, Rac y Cdc42 en conjunto activan a WASP. Adicional a la remodelación del citoesqueleto de actina las Rho GTPasas están asociadas a la activación de otras vías importantes para la regulación de la transcripción génica.

3.9. Actina en Tripanosomátidos.

Una de las peculiaridades de los protozoarios de la familia *Trypanosomatidae* es su citoesqueleto basado en tubulina, el cual ha sido ampliamente estudiado (Gull, 1999). En cambio, han sido muy escasos los datos referentes a actina en estos organismos, y una de las razones es que no se han visualizado los típicos microfilamentos de 5-7nm en el citoplasma de los tripanosomátidos (Mortara, 1989).

La presencia de actina en los tripanosomátidos se ha demostrado en varios trabajos. La distribución de actina parece depender tanto de la especie como del estadio específico que se estudie (en el Cuadro 3 se describen los diferentes estadios de algunos tripanosomátidos mencionados en ésta sección). El primer trabajo fue realizado a principios de los años 1980's, cuando recibía gran atención el estudio de los microfilamentos de actina en diferentes tipos celulares, ya que éstas estructuras pudieron visualizarse a través de la microscopía de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos marcados con fluorocromos (por ejemplo, fluoresceína o rodamina). Siguiendo esta técnica, y utilizando anticuerpos heterólogos contra actina, De Souza *et al* (1983) localizaron la proteína en epimastigotes de *T. cruzi*. Observaron que actina de *T. cruzi* no formaba microfilamentos, y que en cambio, presentaba una distribución difusa a través de todo el cuerpo celular y el flagelo, estando un poco más concentrada en ésta última estructura. En este mismo estudio se demostró que el flagelo del promastigote *Herpetomonas samuelpeessoai* (*H. samuelpeessoai*), un tripanosomátido no patógeno, también contenía actina. Años después, en 1989, Mortara realizó un estudio bioquímico y de inmunolocalización de actina en varios tripanosomátidos utilizando un anticuerpo monoespecífico contra actina de músculo esquelético de conejo. Primero, identificó la presencia de actina de en epimastigotes de *T. cruzi*, en promastigotes de *H. samuelpeessoai* (promastigotes) y de *Leishmania mexicana* como una proteína de 43 kDa. Luego, tratando de aislar una de estas actinas, pasó lisados de promastigotes de *H. samuelpeessoai* por una columna de cromatografía de afinidad para DNasal; sin embargo, ésta no se unió a la DNasal inmovilizada, indicando un comportamiento inusual al de las actina de eucariontes superiores. Este comportamiento también se ha reportado para las actinas de algunos ciliados (Hirono *et al.*, 1989; Hirono *et al.*, 1992) y de *E. histolytica* (Gadasi, 1982). También realizó una extracción con detergente del

Cuadro 3.
Ciclos de vida de *T. brucei*, *Leishmania* y *Herpetomonas samuelpessoai*.

T. brucei es un parásito protozoario extracelular que causa la enfermedad del sueño en humanos y la enfermedad de Nagana en el ganado. En su ciclo de vida se observan varios estadios flagelados: en el hospedero mamífero se encuentra **la forma sanguínea**, que puede encontrarse en su forma proliferativa, que se caracteriza por tener un cuerpo largo y agosto, o en su forma no proliferativa con un cuerpo corto y ancho; Por otro lado, en el vector, la mosca tsetsé, se encuentra en el estómago **la forma procíclica**, que es proliferativa, y **la forma metacíclica** localizada en las glándulas salivares, que son quiascentes. Ryan y Ray, 2004.

Leishmania es el agente etiológico de la enfermedad zoonótica Leishmaniasis o kala azar, que causa una variedad de síntomas, desde úlceras cutáneas hasta enfermedades viscerales fatales. El parásito alterna entre **el amastigote** intracelular en el hospedero vertebrado, y **el promastigote** extracelular en los mosquitos hematófagos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, familia Psychodidae. El promastigote, que es elongado con un flagelo libre, y está presente en el insecto vector; y el amastigote intracelular del hospedero mamífero. Ambos son estadios proliferativos. Ryan y Ray, 2004.

Herpetomonas samuelpessoai es un tripanosomátido no patógeno aislado del insecto *Zelus leucogrammus*. *H. samuelpessoai* posee tres diferentes estadios morfológicos durante su ciclo de vida tanto en cultivos como en el vector invertebrado: **el promastigote**, **el paramastigote**, y **el opisthomastigote** (Souza y Araujo, 2007). El promastigote, elongado y flagelado, es la única forma capaz de dividirse.

citoesqueleto de tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* y promastigotes de *H. samuelpessoai*, y observan que la proteína es retenida mayoritariamente en la fracción de citoesqueleto, sugiriendo una asociación de actina con los microtúbulos subpeliculares. Con microscopía de fluorescencia, utilizando el anticuerpo heterólogo contra actina, localizó la proteína en promastigotes de *H. samuelpessoai* y en epimastigotes de *T. cruzi*. En *H. samuelpessoai*, observa que actina se concentra en la región cercana al bolsillo flagelar, con lo cual sugiere un papel de actina a procesos como endocitosis y exocitosis. En *T. cruzi* observó una distribución homogénea en el cuerpo celular, dato consistente con lo reportado por De Souza *et al* (1983), sin embargo, en este estudio Mortara (1989) no observó actina en el flagelo de ambos organismos. Es posible que ésta diferencia se deba a una reactividad distinta de los anticuerpos utilizados en cada estudio o a diferencias en la preparación de las muestras. En este trabajo también se probó la reactividad de faloidina marcada con el fluorocromo rodamina a través de microscopía de epifluorescencia, observándose un patrón granular tenue a través de las células. Finalmente, probó el efecto de las drogas Citocalasina B o CB y Faloidina en

promastigotes de *H. samuelpessoai* sin observar efectos en el crecimiento, movimiento y morfología.

En 1988, Ben Amar *et al.* demostró la presencia y expresión a nivel de ARN mensajero de los genes de actina de *T. brucei*; en 1994 se caracterizó el gen actina de *Leishmania major* (De Arruda y Matsudaira, 1994) y en el 2003, nuestro grupo de investigación caracterizó el de *T. cruzi* (ver adelante más detalles). Shi *et al* (2000) demostraron que en las formas procíclicas de *T. brucei* la regulación negativa por interferencia del ARN mensajero de actina no producía ningún efecto. Posteriormente, aprovechando la tecnología de construcción y expresión de proteínas recombinantes para generar anticuerpos monoespecíficos contra las actinas de *Leishmania* y *T. brucei*, Sahasrabudde *et al* (2004) y Garcia-Salcedo *et al* (2004) realizan estudios bastante completos en donde se describen y caracterizan aspectos estructurales, de localización y funcionales de la proteína actina de estos tripanosomátidos.

En el estudio de actina en *Leishmania* (Sahasrabudde *et al.*, 2004), se generaron anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína para estudiar algunas propiedades bioquímicas de actina, y su organización y distribución a través de microscopía de inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Se demuestra que la actina de *Leishmania* migra con un peso de 42 kDa (peso molecular similar al reportado por Mortara en 1989) y que está presente tanto en promastigotes como en amastigotes. A diferencia de la actina de mamíferos, la actina de *Leishmania* se encontró mayoritariamente en la fracción monomérica, en la fracción soluble a Tritón X-100 (en células de mamífero es de ~ 50 % en *Leishmania* se encontró el ~ 70%). La actina restante, que es insoluble al detergente, se encontró formando filamentos pequeños (oligómeros). De manera interesante, éstos oligómeros de actina no son teñidos por faloidina, ni pueden ser disociados por las drogas Latrunculina B o Citocalasina D. Además, la expresión de la actina de *Leishmania* en células de mamíferos no modificó sus propiedades de polimerización (forma los oligómeros, pero no forma filamentos más largos), lo cual indicó que ésta propiedad no depende de la interacción con proteínas que asisten la polimerización en las células de mamíferos. Se concluye que al parecer todas estas peculiaridades son determinadas por diferencias en la secuencia de aminoácidos de varios dominios importantes en la actina de *Leishmania* con respecto a la actina de otras células: actina de *Leishmania* tiene una identidad del ~ 70 % con las actinas de

mamíferos, sin embargo, las diferencias ocurren principalmente en la superficie de la molécula, entre los que se incluyen el *loop* de unión a DNasa I (38-52 aa) y el tapón hidrofóbico (262-274 aa), que son los principales sitios de asociación entre monómeros en la polimerización. Por otro lado, la localización de actina se estudió con microscopía de fluorescencia en promastigotes y amastigotes intracelulares (infectando macrófagos de ratón) de *Leishmania*. La señal de actina en el promastigote es granular y se encuentra a través de todo el cuerpo celular y el flagelo. En este estudio no se da una descripción detallada de la localización de actina en los amastigotes intracelulares, además, la micrografía no permite apreciar con detalle la distribución de la señal. También, realizaron microscopía electrónica de transmisión, revelándose datos más detallados sobre la localización de actina en los promastigotes, ésta se localizó en varias estructuras celulares, que se enlistan a continuación, junto al papel de actina en estas estructuras especulado por los autores: 1) A lo largo del flagelo; actina podría tener un papel análogo al reportado en otros flagelos. Por ejemplo, en *Chlamydomonas* y otros organismos, actina es una subunidad de las dineínas del brazo interno del axonema, el complejo de proteínas que produce la fuerza para el movimiento de cilios y flagelos (Piperno y Luck, 1979; Muto *et al.*, 1994; Yanagisawa y Kamiya, 2001; Watanabe *et al.*, 2004). 2) En el bolsillo flagelar; actina podría estar involucrada en la endocitosis. 3) En el cinetoplasto, en asociación con ADN mitocondrial y superficie del cinetoplasto; la proteína podría tener un papel en la remodelación de la red del ADN del cinetoplasto y posicionamiento del cinetoplasto. 4) Asociada al citoesqueleto cortical; actina podría asistir a los microtúbulos subpeliculares en su asociación a la membrana plasmática para mantener la forma celular. Y 5) En el núcleo, en la membrana nuclear y en asociación al ADN nuclear; actina podría tener un papel en la remodelación de la cromatina y transporte de ARNs. En general, este estudio demostró que la actina de *Leishmania* era una isoforma de actina con propiedades estructurales y de polimerización diferente a otras actinas, sin embargo, ha quedado pendiente demostrar su funcionalidad en las diferentes estructuras celulares en donde fue localizada.

En el estudio de actina de *T. brucei* (Garcia-Salcedo *et al.*, 2004) se identificó la proteína en ensayos western blot con un peso de 44 kDa utilizando un suero policlonal contra la proteína recombinante GST-actina. La cantidad de la proteína fue similar en los dos estadios del parásito, estadio procíclico y estadio sanguíneo. La determinación de la localización de actina con microscopía de fluorescencia demostró que ésta era diferente

entre los estadios: en las formas sanguíneas actina co-localizaba con la vía de endocitosis, mientras que en los procíclicos actina no se mostraba polarizada. En este estudio se aprovechó la técnica de ARN de interferencia para abatir el ARN mensajero de actina. En las formas sanguíneas se observó que el crecimiento se detenía, y se perdía la actividad de endocitosis y de tráfico vesicular desde la membrana del bolsillo flagelar. En contraste, las formas procíclicas continuaron creciendo y dividiéndose (como ya habían reportado Shi *et al* en el 2000), aunque se observó a nivel de microscopía electrónica de transmisión que la región trans del aparato de Golgi estaba distorsionada y alargada. Consistente con los datos anteriores, se observó un efecto inhibitorio de la droga Latrunculina A en el crecimiento de las formas sanguíneas pero no en las procíclicas, sugiriendo que el ensamblaje de F actina es un paso determinante para la función en las formas sanguíneas. Este trabajo fue muy importante porque demostró por primera vez de manera directa una función para actina en un tripanosomátido, función que además es estadio específica, lo cual mostró la importancia de considerar a todos los estadios de los tripanosomátidos en el estudio de la expresión, localización y función de genes.

En la tabla 4 se resumen algunas características, propiedades y funciones de actinas de los tripanosomátidos, de los ciliados y de los apicomplexos, con los que comparten algunas características y propiedades que resultan inusuales al compararlas con la de las actinas de otras células eucariontes. En los ciliados estas propiedades muy peculiares han sido adjudicadas a diferencias en las secuencias expuestas en la superficie de la molécula de actina (Villalobo *et al.*, 2001; Sahoo *et al.*, 2006).

Tabla 4. Resumen de algunas características, propiedades y funciones de actinas de los tripanosomátidos *T. cruzi*, *T. brucei*, *Herpetomonas* y *Leishmania*, y de ciliados y apicomplexos en general (para más detalles consultar el texto).

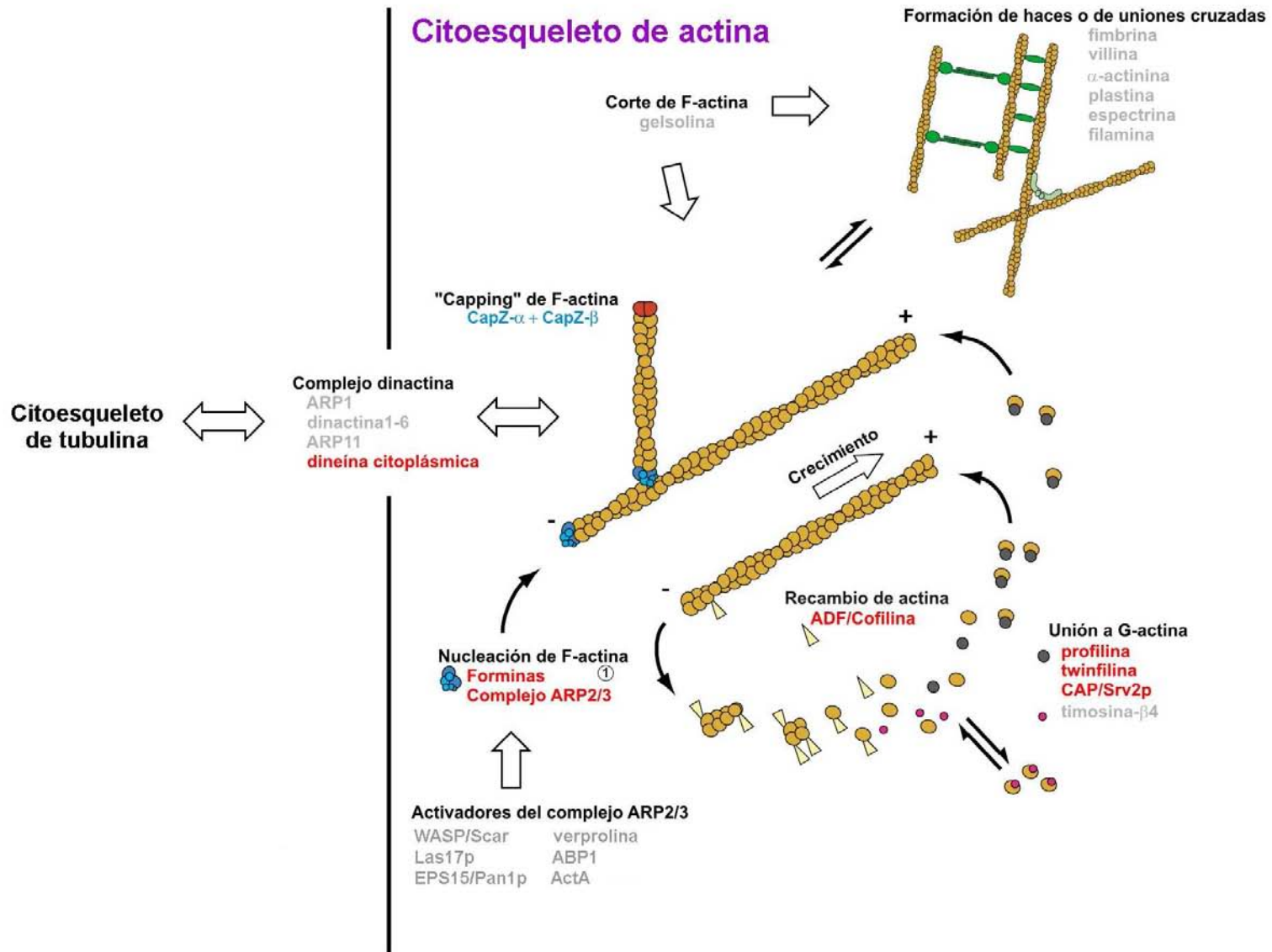
| Organismo | Actina PM | Localización | Unión a DNasa I | Efecto o unión de faloidina | Efecto de Citocalasinas | Efecto de Latrunculinas | Función |
|---------------------------------------|-----------|--|-----------------|--|--|--|----------------------------------|
| <i>T. cruzi</i> | | | | | | | |
| • Epimastigotes | 43 kDa | Difusa a través del cuerpo celular y flagelo (MF). | ND | ¿Patrón Granular? | CB [6µM], endocitosis y transporte vesicular | ND | ND |
| • Tripomastigotes metacíclicos | 43 kDa | Asociada a microtúbulos (ED). | ND | ND | ND | ND | ND |
| • Tripomastigotes sanguíneos | ND | ND | ND | ND | ¿CB, morfología y movimiento? * | ND | ND |
| • Amastigotes | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| <i>T. brucei</i> | | | | | | | |
| • Tripomastigotes procíclicos | 44 kDa | Difusa a lo largo del cuerpo celular y flagelo (MF). | ND | ND | ND | LA [2.5 - 25µM], sin efecto | Estructura del aparato de Golgi. |
| • Tripomastigotes sanguíneos | 44 kDa | Localizada en la vía de endocitosis (MF) | ND | ND | ND | LA [2.5 - 25µM], letal. | Endocitosis, viabilidad. |
| <i>Herpetomonas</i> | | | | | | | |
| • Promastigotes | 43 kDa | Localizada en flagelo (ED) y bolsillo flagelar (MF). | No se une | ¿Patrón Granular? Sin efecto [2µM]. | CB [25µg/ml], sin efecto | ND | ND |
| <i>Leishmania</i> | | | | | | | |
| • Promastigotes | 42 kDa | Patrón granular a través del cuerpo celular y flagelo (MF). Varias estructuras celulares (ME). Asociada a microtúbulos (ED). | ND | No se une | CD, sin efecto | LB, no disocia los oligómeros de actina. | ND |
| • Amastigotes | ND | Cuerpo celular (MF). | ND | ND | ND | ND | ND |
| Ciliados | 43kDa | Varias estructuras celulares. | No se une | No se une | CD, Inhibe fagocitosis | LB, inhibe Fagocitosis | Varias |
| Apicomplexos | 43kDa | Complejo apical. | Sí | No se une | CD, inhibe locomoción | ND | Locomoción celular |

ND, no se ha determinado; MF, microscopía de fluorescencia; ME, microscopía electrónica; ED, extracción con detergentes; Asterisco (*), se presentan como datos no publicados, no hay experimentos que avalen estos resultados. Los detalles de actina en ciliados se pueden consultar en Villalobo *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2006; y Zackroff y Hufnagel, 2002. La de apicomplexos en Sahoo *et al.*, 2006.

En agosto del 2005 se publicaron las secuencias de los genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* (El-Sayed *et al.* 2005; Berriman *et al.* 2005; Ivens *et al.* 2005). El análisis *in silico* del citoesqueleto de los tres organismos corroboró que éste se basa en un muy elaborado citoesqueleto de tubulina. Por otro lado, se identifican pocos componentes del citoesqueleto de actina (Figura 6). Tienen a las proteínas profilina, CAP/Srv2p, twinfilina que regulan la polimerización de actina uniéndose a actina G; también está presente la proteína despolimerizante ADF/cofilina, y el complejo ARP2/3 y la proteína formina, involucrados en la nucleación, polimerización y ramificación de filamentos de actina; sin embargo, no se identificaron homólogos a proteínas WASP/Scar involucrada en la activación de los nucleadores. No se identificaron proteínas similares a las que se han implicado en la formación y en el corte de haces y redes de actina (por ejemplo, gelsolina, fimbrina, villina, α -actinina, plastina, espectrina y filamina); y tampoco se detectaron los componentes del complejo dinactina, un importante conector del citoesqueleto de actina con el de tubulina. Interesantemente, se demostró que de los genomas de los tres organismos, únicamente el de *T. cruzi* ha retenido el complejo capping de F-actina CapZ (proteína formada por las dos subunidades CapZ- α y CapZ- β , que forma un casquete o “cap” en el extremo barbado de los filamentos de actina para estabilizarlos y no permitir la adición de más monómeros de actina). En los tres organismos se identificaron dos clases de miosinas, la proteína miosina de clase I (MyoI) y una nueva familia de miosinas de cinetopláستidos; *T. brucei* y *L. major* tienen un solo miembro de ambas familias, pero *T. cruzi* ha expandido la familia de miosinas de cinetopláستidos a siete miembros con una considerable diversidad de secuencias. Estos datos sugieren diferencias en la función y regulación de actina entre las especies de tripanosomátidos. En el caso particular de *T. cruzi*, la diferencia puede recaer, entre otras cosas, en que a contraste de *T. brucei* y *L. major*, cuyos ciclos de vida transcurren a través de dos estadios (*T. brucei*, tripomastigote sanguíneo y tripomastigote procíclico, ambas formas flageladas; y *L. major*, la forma flagelada promastigote y el amastigote, aflagelado), presenta tres estadios, lo cual sugeriría mayor complejidad morfológica y quizás funcional.

Nuestro grupo de investigación caracterizó la organización génica de actina de *T. cruzi*, identificándose tres copias del gen que codifican para la misma proteína actina (Cevallos *et al.*, 2003). La traducción de su secuencia de nucleótidos predice una proteína con 376 aminoácidos y un peso molecular de 43 kDa.

Figura 6. Componentes del citoesqueleto de actina de tripanosomátidos según la secuencia de sus genomas. *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* contienen genes que codifican para algunas proteínas homólogas involucradas en la unión a actina monomérica y en la nucleación de los filamentos de actina, sin embargo, carecen de genes homólogos de proteínas para la formación y el corte de haces y redes de actina, y componentes del complejo dinactina. Los nombres de las proteínas en color rojo son las que están presentes en los tres organismos, en color azul solamente en *T. cruzi*, y en color gris las ausentes en estos tripanosomátidos. Imagen modificada de Berriman *et al.*, 2005.



La comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de actina de *T. cruzi* con las actinas de otros organismos, indica que ésta se encuentra mayoritariamente conservada: es muy parecida a las actinas de otros tripanosomátidos, *T. brucei* (94 % idénticas) y *Leishmania major* (89 % idénticas); tiene una identidad del 71 % con las actina de eucariontes superiores como *Sacharomyces cerevisiae*, *Caenorabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*, y con la de *Arabidopsis thaliana* un 72 % (Apéndice 1). El análisis filogenético de actinas siempre ha revelado un alto nivel de similitud, sin embargo, se ha reportado que existen diferencias clave en las secuencias de actina de algunos protozoarios que parecen ser las responsables de las propiedades estructurales, de polimerización y funcionales no convencionales (Sahasrabuddhe *et al.*, 2004; Sahoo *et al.*, 2006). En este sentido, será interesante analizar la secuencia de actina de *T. cruzi*.

En epimastigotes se demostró que el gen de actina se expresa como un ARN mensajero maduro de 1.6 kb (Cevallos *et al.*, 2003). En este estudio se observó que la concentración de este ARN mensajero variaba a diferentes tiempos durante el crecimiento en cultivos axénicos de epimastigotes, aumentando durante la fase media logarítmica, y decayendo a niveles mínimos en la fase estacionaria; sin embargo, posteriormente se demostró que este ARN mensajero de actina era 7.1 veces más estable en la fase estacionaria que en la fase media logarítmica (Cevallos *et al.*, 2005). Este mismo fenómeno se observó en ARN mensajero de otros genes de mantenimiento y para algunos ARN ribosomales, lo cual sugirió la presencia de un mecanismo global de regulación que protege los transcritos de la degradación en la fase estacionaria (Cevallos *et al.*, 2005). Quizás éste mecanismo involucre los gránulos ribonucleoproteínicos llamados cuerpos P descritos en el citoplasma de *T. cruzi*, que capturan ARNm para su protección transitoria durante los periodos de inanición, como ocurre en la fase estacionaria (Holetz *et al.*, 2007; Cassola *et al.*, 2007). En *T. cruzi* el control de la expresión génica ocurre por mecanismos post-transcripcionales, sin embargo, no tenemos datos de lo que ocurre con actina a nivel de proteína (nivel traduccional y post-traduccional) durante la curva de crecimiento de epimastigotes. Será interesante determinar este aspecto considerando que en la fase estacionaria ocurren importantes cambios morfológicos, que implicarían principalmente cambios en la expresión y organización de proteínas de citoesqueleto, y cambios bioquímicos, por ejemplo, se ha

descrito un aumento en la actividad proteolítica (Pance y Henríquez, 1992; Henríquez *et al.*, 1993).

Existe un par de datos que sugieren posibles papeles funcionales de actina en *T. cruzi*. Un estudio asocia a actina en la endocitosis de epimastigotes (Bogitsh *et al.*, 1995). En este estudio se observó que el tratamiento de epimastigotes con Citocalasina B, droga desestabilizadora de microfilamentos, disminuía la captación de sacarosa y HRP, y el número de reservosomas contenidos en el parásito; estos datos sugerían que la droga podría estar afectando el proceso de endocitosis y la eficacia del transporte de proteínas en general. Sin embargo, existe la posibilidad de que éstos efectos se deban, al menos en parte, a una inhibición del transporte de azúcares, ya que la Citocalasina B es un potente inhibidor de transportadores como el transportador de glucosa GLUT1 (Bogitsh *et al.*, 1995). En el otro estudio, se tiene una evidencia indirecta sobre un papel de actina en el proceso de adhesión en epimastigotes (De Melo *et al.*, 2006). Los epimastigotes se adhieren a diferentes superficies hidrofóbicas *in vitro* o al epitelio del insecto *in vivo* durante la metaciclologénesis, y lo hacen exclusivamente a través del flagelo (Bonaldo *et al.*, 1988; Kleffmann *et al.*, 1998; Kollien *et al.*, 1998). De Melo *et al.* (2006) caracterizó una proteína GTPasa pequeña Rho de *T. cruzi* (TcRho1). En eucariontes superiores, estas proteínas tienen un papel importante en el movimiento celular, en la fagocitosis, en el transporte intracelular, en la adhesión celular, y en el mantenimiento de la morfología celular, a través de la regulación de microfilamentos de actina. En este estudio se demostró que TcRho1 tiene un papel regulador en la adhesión célula-substrato conservado, ya que se observó que regulaba el evento de unión del flagelo del epimastigote sobre un substrato antes de la diferenciación celular a tripomastigotes metacíclicos. Por otro lado, se han descrito en estudios con microscopía electrónica proyecciones similares a filopodios y estructuras filamentosas similares a desmosoma en el extremo distal del flagelo de los epimastigotes adheridos (Bonaldo *et al.*, 1988; Kollien *et al.*, 1998). Estas son estructuras que en otras células eucariontes involucran a actina (Chhabra y Higgs, 2007).

4. JUSTIFICACIÓN.

Los estudios que demuestran la presencia de actina en *T. cruzi* están limitados al estadio epimastigote (De Souza *et al.*, 1983; Mortara, 1989). En estos estudios, los resultados de la localización de actina en el flagelo no fueron consistentes, sugiriendo una reactividad diferente de los anticuerpos usados. Estos problemas se podrían solucionar con el uso de anticuerpos monoespecíficos y microscopía de mayor resolución, como la microscopía confocal. En nuestro laboratorio se sub-clonó el gen de actina de *T. cruzi* en un vector de expresión como proteína de fusión con glutatión transferasa (Apéndice 2). Una vez expresada la proteína recombinante, se purificó y se empleó para inmunizar un conejo, y obtener un suero con anticuerpos policlonales contra la actina de *T. cruzi*. Este suero será empleado para determinar la expresión y localización celular de la proteína, a través de microscopía confocal, en epimastigotes, y en los otros dos estadios de *T. cruzi*, tripomastigotes y amastigotes. Dado que aun no se define la función de actina en el parásito, los datos de inmunolocalización serán importantes para sugerir posibles papeles funcionales de actina en este organismo.

5. HIPÓTESIS.

Considerando que a través de su ciclo de vida *T. cruzi* presenta cambios morfológicos y funcionales importantes, y que la distribución subcelular de una proteína está relacionada con su función, se propone que la distribución subcelular y función de actina será diferente entre los estadios de *T. cruzi*.

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general.

Determinar la conservación de dominios y residuos funcionalmente importantes de la proteína actina de *T. cruzi*, y caracterizar su expresión y localización subcelular en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

6.2 Objetivos específicos.

- a) Analizar la secuencia de actina para identificar dominios y residuos funcionalmente importantes conservados con respecto a la actina de mamíferos.
- b) Caracterizar el suero policlonal de actina:
 - Demostrar que la proteína recombinante contiene actina de *T. cruzi*.
 - Determinar la reactividad del suero anti actina de *T. cruzi* ante lisados totales de *T. cruzi* y otras actinas (protozoarios y células de mamíferos).
- c) Determinar, mediante ensayos *western blot*, la presencia de actina en lisados totales de los diferentes estadios de *T. cruzi*: epimastigotes de fase media logarítmica y fase estacionaria, tripomastigotes y amastigotes.
- d) Determinar la inmunolocalización de actina por microscopía confocal en: epimastigotes de fase media logarítmica y fase estacionaria, tripomastigotes, y amastigotes intracelulares y liberados por lisis celular.

7. METODOLOGÍA.

7.1 Análisis de la secuencia de actina de *T. cruzi*.

Se alineó la secuencia de aminoácidos de la actina de *T. cruzi* (*T. cruzi* actin1, número de identificación de secuencia en NCBI: gi|33150898|gb|AAP97326.1|[33150898]) con la secuencia de α actina de músculo esquelético de conejo (Alpha-actin-1, número de identificación: gi|62287932|sp|P68135.1|ACTS_RABIT[62287932]) y se identificaron los residuos aminoácidos de cada subdominio de actina. Para determinar la conservación de cada subdominio en *T. cruzi*, se obtuvo el porcentaje de identidad y similitud de las secuencias utilizando el programa LALIGN disponible en la dirección de internet: http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html. También, se buscaron algunas regiones o residuos de actina reportados para varias interacciones y funciones de actina (consultar Tabla 1 en la Introducción y el Apéndice 6) y se determinó el porcentaje de identidad con el programa LALIGN. Finalmente, utilizando el programa Phyre (Cuadro 4) se obtuvieron las coordenadas en tercera dimensión de un modelo de la estructura de actina de *T. cruzi* en formato PDB. Para visualizar el modelo, se empleó el programa Pymol. También, a través de este programa se modificó visualmente el modelo de la molécula de actina de *T. cruzi* identificando y marcando los diferentes subdominios, y resaltando los aminoácidos no conservados con respecto a la actina de mamíferos. El modelo de la estructura de esta actina se comparó con el de la α actina de conejo en el estado ADP (Otterbein *et al.*, 2001), cuyo PDB (clave 1j6z) se obtuvo de la página de internet: <http://www.rcsb.org/pdb/>.

Cuadro 4.

Phyre.

En términos muy generales, Phyre es un servidor modelador de estructuras de proteínas, accesible a través de: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>. El programa Phyre produce un modelo basado en un alineamiento local de la secuencia problema (por ejemplo, la secuencia de la actina de *T. cruzi*) contra su librería de estructuras conocidas. Si la secuencia problema muestra homología significativa a algún dominio de la librería, el dominio es modelado copiando las coordenadas y remarcando los residuos de acuerdo a la secuencia problema. Cuando la secuencia problema presenta inserciones o deleciones con respecto a un templado, el programa busca en su librería de *loops* para escoger un *loop* compatible.

7.2 Obtención de los diferentes estadios de *T. cruzi*.

Se trabajó con epimastigotes (de fase media logarítmica y de fase estacionaria), tripomastigotes y amastigotes (intracelulares y liberados de cultivos de células infectada) de la cepa CL Brener de *T. cruzi*.

7.2.1 Obtención de epimastigotes de fase media logarítmica y fase estacionaria. Los epimastigotes empleados para preparar las curvas de crecimiento provienen de cultivos axénicos que han sido mantenidos en crecimiento logarítmico en medio LIT a 28 °C (Camargo, 1964). Se colectaron epimastigotes en fase media logarítmica y en fase estacionaria de la curva de crecimiento. Se iniciaron curvas de crecimiento con cultivos a una densidad de 1×10^6 epimastigotes. Se tomaron alícuotas de los cultivos cada 24 hr, y se contaron el número de parásitos presentes usando una cámara de Neubauer. La fase media logarítmica (ML) se definió como el tiempo en el que el cultivo de epimastigotes llega a una densidad de $8-12 \times 10^6$ células/ml (día 3). La fase estacionaria (E) se definió como las 72 hr después de que los parásitos en el cultivo dejan de crecer ($85-90 \times 10^6$ células/ml), que corresponden a los 11-14 días después de la inoculación.

7.2.2 Obtención de amastigotes y tripomastigotes. Los amastigotes y tripomastigotes (tripomastigotes sanguíneos) se obtuvieron de la infección de fibroblastos embrionarios de ratón (células NIH3T3) infectados (Apéndice 3).

a) Obtención de amastigotes o tripomastigotes por centrifugación. Al cumplirse 12 días de infección, el sobrenadante del cultivo es una mezcla de parásitos liberados por las células infectadas, presentándose una proporción de 10 % de amastigotes y 90 % de tripomastigotes. Este sobrenadante se colectó en un tubo Falcon de 10 ml. Para separar los restos de las células NIH3T3 de los parásitos, se centrifugó a 4,000 xg durante 5 min. Finalmente, se colectó el sobrenadante, que contiene los tripomastigotes y los amastigotes. Cada estadio se purificó con centrifugaciones de 10 seg en una nanofuga (Hoefer Scientific Instruments). Este paso se repitió varias veces hasta obtener un sobrenadante rico en tripomastigotes

b) Obtención de tripomastigotes por centrifugación usando el anticuerpo específico de amastigotes 2C2B6. Para obtener muestras enriquecidas en tripomastigotes se siguió el siguiente protocolo. Se colectó el sobrenadante de un cultivo con una infección de 12 días, y se centrifugó a 4,000 xg durante 5 min para separar los parásitos (sobrenadante) de los restos del cultivo celular (pastilla). El sobrenadante se centrifugó a 500 xg durante 10 min, y la pastilla se resuspendió en una dilución 1:4 del anticuerpo monoclonal 2C2B6, específico para el principal antígeno de superficie de amastigotes Ssp4 (Andrews, *et al.*, 1987), en DMEM. Se incubó 1 hr a 37 °C para permitir la agregación de amastigotes. Se precipitaron los agregados con centrifugaciones de 3 seg en una nanofuga (Hoefer Scientific Instruments). Este paso se repitió varias veces hasta obtener un sobrenadante rico en tripomastigotes (esto se verificó tomando muestras del sobrenadante que se colocaron en placas de microscopía para observarlas en un microscopio óptico). La pastilla, que corresponde a los agregados de amastigotes, se disgregó por “pipeteo”, obteniéndose una fracción rica en amastigotes.

c) Obtención de amastigotes intracelulares. Los cultivos de células NIH3T3 crecidas en cubreobjetos con 6 o 12 días de infección se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS pH 7.4.

7.2.3 Tinción con HEMA3 de los diferentes estadios de *T. cruzi*. La morfología de las fracciones de los estadios tripomastigote y amastigote liberados obtenidos se monitoreó con la visualización y captura de imágenes en un microscopio de campo abierto (Olympus) de parásitos fijados y teñidos el reactivo de tinción comercial HEMA3 (Fisher Diagnosis), que tiñe similar a la tinción Wright y Wright-Giemsa. Para esto, primero se procedió a colectar de una manera los parásitos centrifugando muestras de los cultivos en tubos eppendorf a 500 xg durante 6 min. La pastilla de células se lavó dos veces con PBS pH 7.4, centrifugando igual que antes después de cada lavado. Para fijar los parásitos, la pastilla se resuspendió en glutaraldehído al 1 % en PBS pH 7.4 estéril, a partir de la cual se tomaron pequeñas muestra que se aplicaron sobre placas silanizadas (SIGMA). Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (TA). Después de permeabilizar con metanol frío durante 10 min, se sumergió la placa con los parásitos fijados dos veces en cada uno de los tres diferentes reactivos de HEMA3. Finalmente, se aplicó medio para montar histológico Permount (Fisher Scientific).

7.3 Ensayos *western blot*.

7.3.1 Obtención de lisados totales de las diferentes células para *western blot*. Los diferentes tipos de células fueron lavadas con PBS pH 7.4 y centrifugadas a 500 xg durante 6 min. Las pastillas se resuspendieron directamente en el amortiguador de carga para proteínas (Apéndice 4).

7.3.2 Obtención de fracciones subcelulares de *T. cruzi* para *western blot*. Para obtener las fracciones soluble e insoluble a Tritón X-100 de los epimastigotes, se siguió el protocolo empleado para *Leishmania* (Sabasrabuddhe *et al*, 2004). Los epimastigotes se trataron con Tritón X-100 (SIGMA) al 1 % en PBS pH 7.4 complementado con inhibidores de proteasas (Apéndice 5) a una concentración final de 2×10^6 células /ml durante 15 min en hielo. Después se centrifugaron a 12,000 xg durante 20 min a 4 °C, obteniéndose en el sobrenadante la fracción soluble, que se aparta en un tubo. La pastilla se lavó con Tritón X-100 al 1 %, y se volvió a centrifugar. El sobrenadante se juntó con la fracción soluble, mientras la pastilla, que representa la fracción insoluble, se resuspendió en buffer de carga para proteínas a un volumen semejante al de la fracción soluble.

7.3.3 Electroforesis de proteínas y *western blot*. En general, para los ensayos de *western blot* se siguieron condiciones similares. Las modificaciones en el método son los anticuerpos y el suero empleados, sus diluciones, y las muestras de lisados celulares empleados (Tabla 5).

Las proteínas de los diferentes lisados (lisados totales de las células 5×10^6 *T. cruzi* o su equivalente en proteínas totales en el resto de células trabajadas) o fracciones soluble e insoluble de los epimastigotes (volúmenes correspondientes a las fracciones obtenidas de 5×10^6 parásitos) se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10 % durante 1 hr 30 min a 15 mA y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) en buffer de Tris-glicina a 150 mA por 3 hr y 15 min a 4 °C. La membrana se incubó con la solución bloqueadora (suero normal de cabra o NGS –de las siglas en inglés Normal Goat Serum– 5 % en PBS) a 4 °C durante 18 hr. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario diluido en Tween (v/v) 0.05 % y NGS 2 % (v/v) en PBS durante 1 hr 15 min a TA. En algunos experimentos se utilizaron dos anticuerpos primarios, cada

Tabla 5. Anticuerpos y suero empleados, sus diluciones, y muestras de lisados celulares empleados en los diferentes ensayos western blot.

| Proteína detectada: | Anticuerpo primario: | Anticuerpo secundario: | Muestras usadas para ver reactividad (lisados totales): |
|---------------------|---|---|---|
| Actina | Anticuerpo comercial de conejo anti-actina A 2066 (SIGMA-Aldrich, Inc.) • Dilución: 1:100 | Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con HRP (Pierce) • Dilución: 1:50,000 | <ul style="list-style-type: none"> • Cultivo de <i>E. coli</i> (transformado con pGEX-actina de <i>T. cruzi</i>) no inducido* • Cultivo de <i>E. coli</i> inducido con IPTG (que sobre-expresa la proteína GST-actina de <i>T. cruzi</i>)* • Proteína recombinante GST-Actina purificada por electroelución* • Células HeLa • Epimastigotes de <i>T. cruzi</i>. |
| Actina | Suero policlonal de conejo contra GST-actina de <i>T. cruzi</i> • Dilución: 1:8,000 | Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con HRP (Pierce) • Dilución: 1:50,000 | <ul style="list-style-type: none"> • Diferentes estadios de <i>T. cruzi</i>: epimastigotes de fase ML y de fase E, tripomastigotes, y amastigotes extracelulares. • Fracciones subcelulares de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> • Formas procíclicas de <i>Leishmania mexicana</i> ** • Taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i> ** • Trofozoitos de <i>Trichomonas vaginalis</i> ** • Células HeLa • Células NIH3T3 ** |
| α Tubulina | Anticuerpo monoclonal de ratón anti α tubulina (Amersham Life Science, N356 ***) • Dilución: 1:30,000 | Anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con HRP (Pierce) • Dilución 1:30,000 | <ul style="list-style-type: none"> • Epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de fase ML y de fase E • Fracciones subcelulares de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> |

* Consultar Apéndice 2.

** Las muestras de cultivos de los protozoarios empleados para este experimento fueron amablemente proporcionados por la Dra. Rosalía Lira (*Leishmania mexicana*), el Dr. Rafael Saavedra (*Toxoplasma gondii*), y la Dra. Imelda López (*Trichomonas vaginalis*) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los lisados totales de células NIH3T3 fueron un obsequio de la Dra. Rebeca Manning del CINVESTAV.

*** Obsequio de la Dra. Imelda López.

uno de ellos a su dilución óptima (Tabla 5). Se le realizaron 3 lavados de 10 min c/u con 0.05 % de Tween (v/v) en PBS por 10 min a TA. Después, la membrana se incubó con el/los anticuerpo(s) secundario(s) diluido(s) en Tween-NGS en PBS durante 1 hr a TA. Se realizaron los lavados como los indicados anteriormente. Finalmente, la membrana se trató con el reactivo comercial quimioluminiscente Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce), se expuso a placas autorradiográficas (Amersham Pharmacia), y se reveló manualmente.

7.4 Inmunodetección de actina con Microscopía Confocal.

Los epimastigotes de fase ML o E, los tripomastigotes o los amastigotes se colectaron y lavaron como se indicó para la tinción con HEMA3 y se fijaron sobre placas para microscopía silanizadas (SIGMA) con paraformaldehído 4 % en PBS pH 7.4 durante 30 min a TA en una cámara húmeda. Las células NIH3T3 infectadas, que se cultivaron sobre cubreobjetos, se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS pH 7.4. Las diferentes muestras de parásitos aislados o células infectadas se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1 % en PBS pH 7.4 durante 30 min a TA. Luego de bloquearse con BSA 2 % en PBS pH 7.4 durante 2 hr a TA, se aplicó una dilución de 1:250 en BSA 1 % en PBS pH 7.4 del suero inmune o el suero pre-inmune como control, y se incubaron durante 18 hr a 4 °C. Se realizaron 3 lavados de 15 min con BSA 1%, con agitación y a TA. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario de cabra anti IgG de conejo conjugado con FITC (Santa Cruz Biotech) a una dilución 1:200 en BSA 1 %, incubándose durante 30 min a TA en oscuridad. Se volvió a lavar con BSA 1% como se mencionó anteriormente. Finalmente se montaron para la microscopía confocal con medio para montar Vectashield conteniendo yoduro de propidio (Vector Laboratories), el cual tiñe el ADN, permitiendo localizar el núcleo y el cinetoplasto del parásito. Las muestras se analizaron en un microscopio confocal LSM 5 Pascal de ZEISS.

8. RESULTADOS.

8.1 Análisis de la secuencia de actina de *T. cruzi*.

La estructura cristalográfica de α actina de músculo esquelético de conejo ha sido caracterizada y en ella se han identificados los residuos aminoácidos que conforman cada subdominio en la estructura tridimensional de la molécula (Otterbein *et al.*, 2001) y aquellos residuos involucrados en varias propiedades de actina (Dos Remedios *et al.*, 2003, revisión). La alineación de las secuencias de ésta actina con las de *T. cruzi* permitió identificar los correspondientes aminoácidos de cada subdominio en la actina de *T. cruzi*, y también determinar qué tan conservados se encuentran (Tabla 6 y Figura 7). Los resultados de ésta comparación de secuencias, indican que los residuos más conservados se encuentran en los subdominios 1b y 3a. Estas son regiones que constituyen el centro hidrofóbico interno de actina (bolsillo hidrofóbico) asociado a la unión al nucleótido y a la unión al catión; la mayoría de los residuos específicos asociados a éstas funciones están bien conservados en la actina de *T. cruzi* (Figura 7). En cambio, los subdominios 2, 4, y 3b, que están localizados en la superficie de la molécula, se encuentran menos conservados en la actina de *T. cruzi* (Figura 7). Estas regiones incluyen, los sitios de unión a DNasa I y otras ABPs, y aquellos asociados a las interacciones actina-actina en los microfilamentos. En *T. cruzi*, el sitio de unión a DNasa I no está conservado, por lo tanto, es probable que no haya actividad de unión a DNasa I, tal y como ocurre con la actina del tripanosomátido *H. samuelpessoai* (Mortara, 1989). El modelo tridimensional de actina de *T. cruzi* obtenido con los programas Phyre (para el plegamento, el programa se basó principalmente tomando como referencia la estructura cristalográfica de la α actina de conejo PDB:clesvA) y Pymol muestra una proteína estructuralmente parecida a la actina de conejo (Figura 8). La localización de los residuos aminoácidos no conservados en este modelo estructural de actina de *T. cruzi* permitió corroborar su presencia en la superficie de la molécula (Figura 8). Es interesante observar que los *loops* de unión a DNasa I y H están presentes en este modelo, a pesar de su alto contenido de residuos aminoácidos divergentes (Figura 8). El modelo de la actina de conejo presenta un *loop* de unión a DNasa I formando una pequeña hélice α ; esta estructura está ausente en el *loop* de *T. cruzi* (el cual no está estructurado). También, se puede observar que el *loop* H de la actina de *T. cruzi* tiene una estructura β plegada

más corta que la α actina de conejo. Estas observaciones sugieren alguna importancia estructural y funcional en éstas regiones. Por otro lado, se determinó la conservación de los sitios de interacción de actina con algunas ABPs reportados (Dos Remedios *et al.*, 2003, revisión) en la secuencia de residuos aminoácidos en *T. cruzi*. Los sitios de ADF/cofilina (identidad: 76.9 %), profilina (90.5 %), CapZ (91.3 %) y gelsolina (72.1 %) están conservados (Apéndice 6). En cambio, no están muy conservados los sitios de interacción con timosina β 4 (42.9 %), las regiones de interacción con el complejo ARP2/3 (correspondiente a gran parte de los subdominios 2 y 4: ~ 58 % de identidad), y el principal sitio de interacción con miosinas, el extremo amino terminal. ADF/cofilina, profilina y CapZ, ABPs muy conservadas entre los eucariontes, están presentes en el genoma de *T. cruzi*. Aunque los sitios de actina relacionados a la unión a CapZ están conservados en *Leishmania* y en *T. brucei*, CapZ es una proteína “perdida” en sus genomas (Apéndice 1; Berriman *et al.*, 2005). Gelsolina y timosina β 4 son ABPs ausentes en el genoma de *T. cruzi*. Gelsolina, una proteína que corta filamentos, no es muy conservada entre los eucariontes; sin embargo sus sitios de unión en actina están conservados en *T. cruzi* (Dos Remedios *et al.*, 2003, revisión). Timosina β 4 es una proteína secuestradora de actina G restringida solo a metazoarios, sus sitios de interacción en actina no se están conservados en *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005; Berriman *et al.*, 2005). De las regiones involucradas en la asociación entre actinas 64.5 % están conservadas (Apéndice 6). Tres de éstas regiones son bastante divergentes: una región corresponde a los primeros residuos aminoácidos del extremo amino terminal (2 - 5 aa), otra es el *loop* de DNasa I (38 - 52 aa), y una última es el *loop* H (262 - 274 aa), ésta última estructura, en particular, es muy importante para la formación y estabilización de los microfilamentos, ya que es esencial para los contactos laterales entre las hebras del filamento de actina (Dos Remedios *et al.*, 2003, revisión). También, de los residuos importantes para las interacciones intermoleculares entre actinas reportados por Kim *et al.* (2000) -Tabla 1-, únicamente S265 no está conservado en la secuencia de actina de *T. cruzi* (Apéndice 6). Los residuos aminoácido asociados a la interacción con las drogas Latrunculina y Faloidina están conservadas en *T. cruzi* (Apéndice 6). La droga Faloidina (un estabilizador de filamentos) marcado con rodamina, es muy empleada en células de metazoarios y levadura para inmunolocalizar microfilamentos, sin embargo, en *T. cruzi* solo da un patrón granular (Mortara, 1989). Todos estos datos sugerirían propiedades diferentes de la actina de *T. cruzi* para polimerizar y para asociarse con algunas ABPs,

que finalmente, también repercutirían en la organización y función del citoesqueleto de actina.

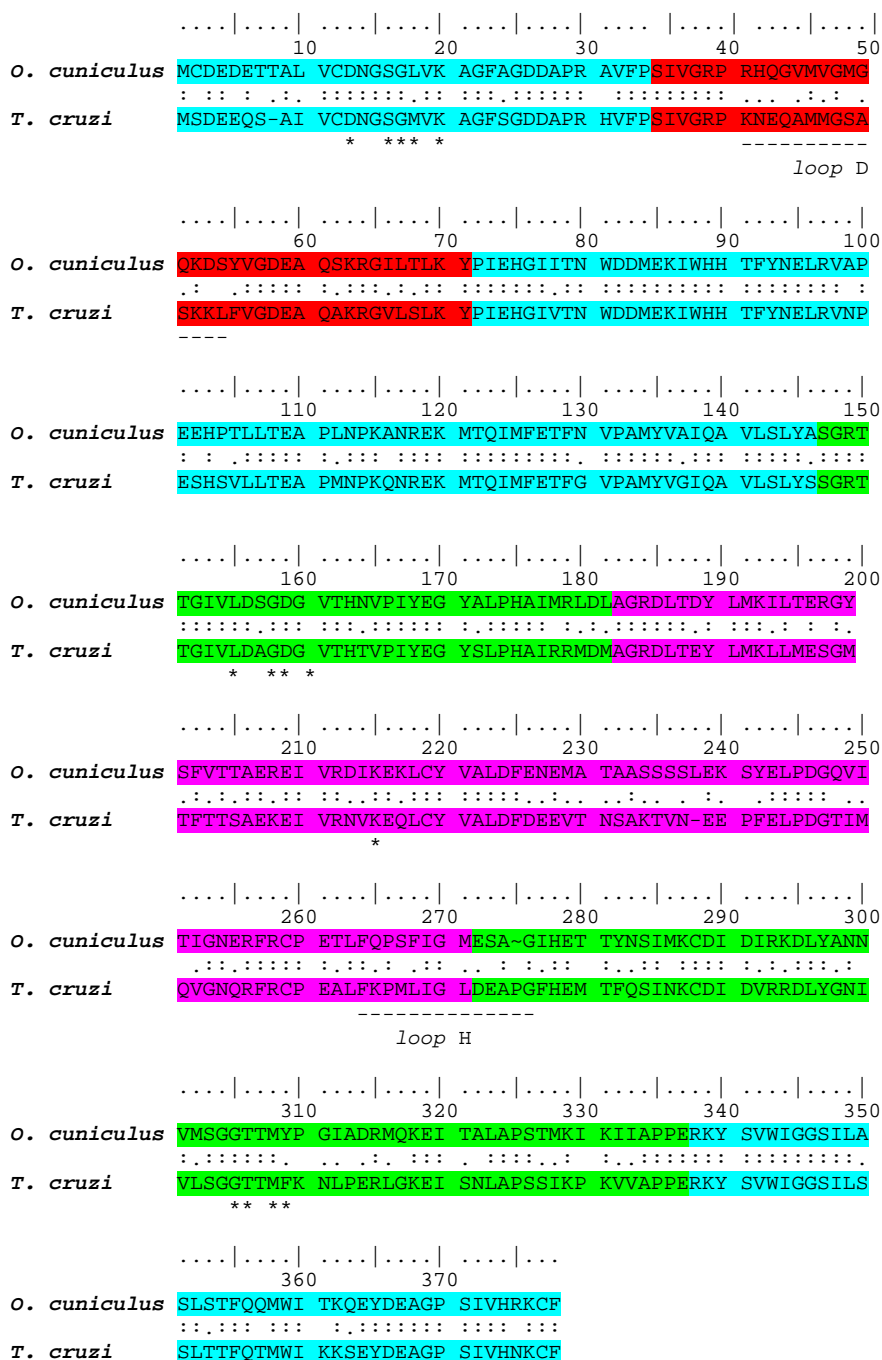
Tabla 6. Porcentajes de identidad y similitud entre Los diferentes subdominios de la α actina de músculo esquelético de conejo y la actina de *T. cruzi*.

| Secuencia comparada | Completa | Subdominio 1 | | | Subdominio 2 | Subdominio 3 | | Subdominio 4 |
|----------------------|----------|--------------|----------|-----------|--------------|--------------|-----------|--------------|
| | | 1a | 1b | 1c | | 3a | 3b | |
| Aminoácidos | 1-375 | 1-32 | 70-144 | 338-375 | 33-69 | 145-180 | 270-337 | 181-269 |
| | 1-377 * | 1-34 * | 72-146 * | 341-378 * | 35-71 * | 147-182 * | 272-340 * | 183-271 * |
| Identidad (%) | 70.9 | 76.5 | 86.7 | 85.4 | 59.5 | 86.7 | 58.5 | 58.4 |
| Similitud (%) | 91 | 88.2 | 94.7 | 92.7 | 89.2 | 97.2 | 86.2 | 91 |

Los porcentajes de identidad y similitud entre las actinas se obtuvieron con el programa LALIGN.

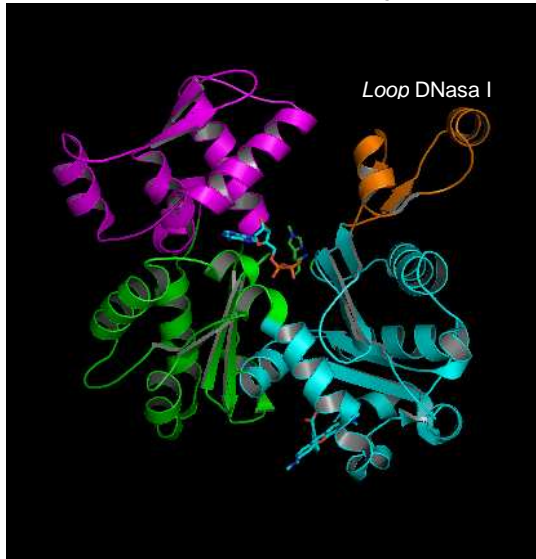
* Numeración de residuos aminoácidos de la secuencia de la actina conejo correspondientes a cada subdominio, obtenida después de adicionar los dos primeros residuos (omitidos inicialmente en los estudios cristalográficos de la proteína de conejo), y alinear las dos actinas (lo cual origina en la proteína de *T. cruzi* una inserción en la posición 276 y dos deleciones en las posiciones 8 y 236).

Figura 7. Alineamiento de las secuencias de α actina de músculo esquelético de conejo (377 aa) y la actina de *T. cruzi* (376 aa).

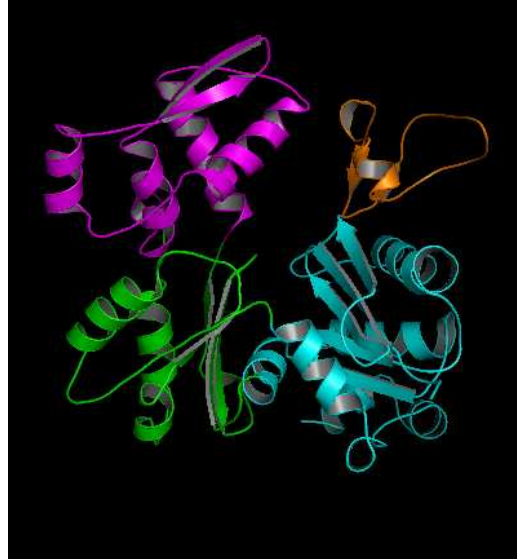


Se muestran los residuos aminoácidos correspondientes a cada subdominio de actina: 1, 2, 3 y 4. Dos puntos (:) indican residuos idénticos, y un punto (.) los residuos conservados. También, se indican con un asterisco (*) los residuos que se ha demostrado participan en la unión al nucleótido, y las regiones de los loops D (DNasal) y H (tapón hidrofóbico).

A. Actina de conejo:



B. Actina de *T. cruzi*:



C. Actina de *T. cruzi*:

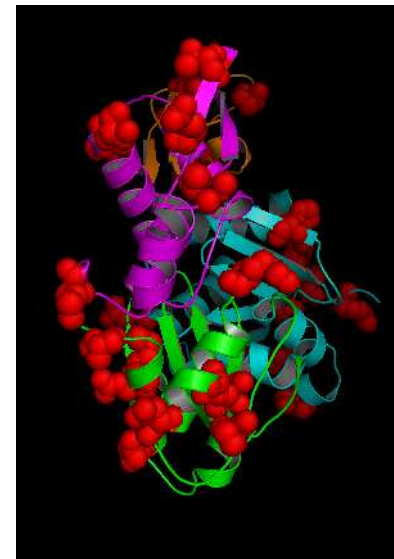
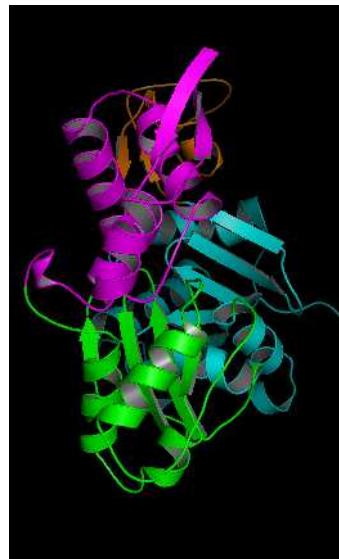
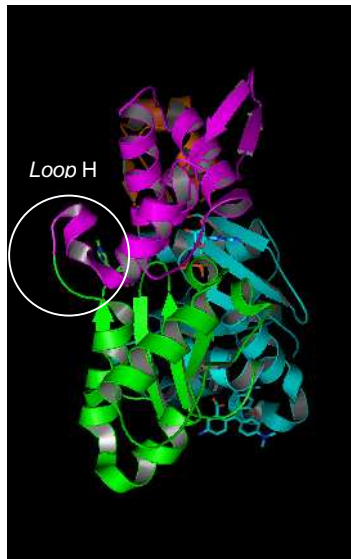
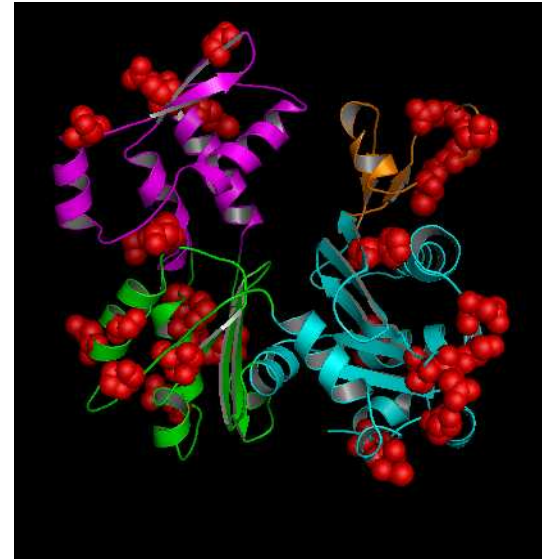


Figura 8. Modelo estructural de la actina de *T. cruzi*. Dos diferentes vistas de los modelos de la estructura de la actina a de músculo esquelético (A) y la actina de *T. cruzi* (B y C) obtenidos con los programas Phyre y Pymol. Se indican el *loop* DNasal y el *loop* H. En C se muestran como esferas rojas los aminoácidos no conservados en la actina de *T. cruzi*. Se muestran en diferentes colores los subdominios de actina: **1** verde, **2** azul, **3** morado y **4** naranja.

8.2 Obtención de los diferentes estadios de *T. cruzi*.

Los epimastigotes de fase media logarítmica (ML) se obtuvieron al tercer día de la inoculación del cultivo axénico, y 11 días después, los de la fase estacionaria (E) (Figura 9). En la figura 10 se muestran las imágenes de epimastigotes de fase ML y fase E teñidos con HEMA3, en donde pueden apreciarse las diferencias morfológicas entre los epimastigotes de cada fase: los epimastigotes de fase ML (cuerpo redondeado con un flagelo corto) se transforman en células alargadas con un flagelo largo en la fase E. En algunos parásitos se puede identificar que la reorganización de componentes subcelulares (cinetoplasto y núcleo) ha sido iniciada por lo que se consideran formas intermedias. Aproximadamente un 5 % de los parásitos de fase E completan su diferenciación a tripomastigotes metacíclicos.

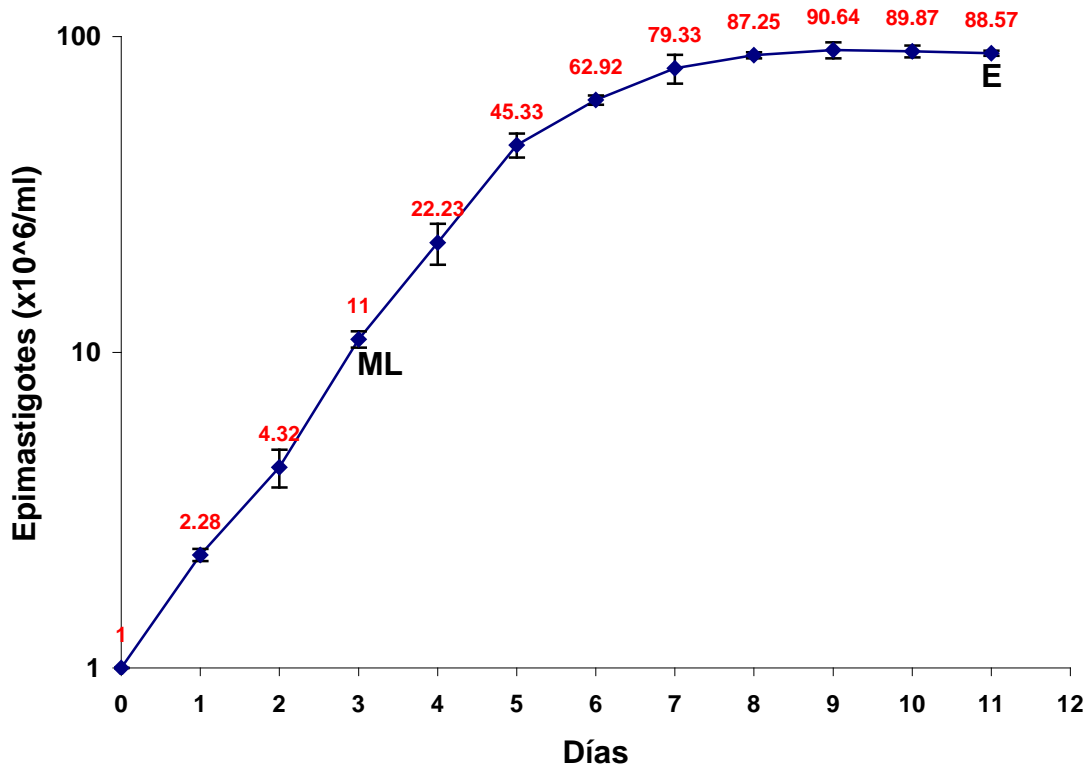


Figura 9. Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*. El cultivo se inició con un inóculo de 1×10^6 epimastigotes. Se tomaron alícuotas de los cultivos en los tiempos indicados, y se contó el número de parásitos usando una cámara de Neubauer. La fase media logarítmica (ML) se definió como el tiempo en el que el cultivo de epimastigotes llega a una densidad de $8\text{-}12 \times 10^6$ células / ml (día 3). La fase estacionaria (E) se definió como las 72 hr después de que los parásitos en el cultivo dejan de crecer ($85\text{-}90 \times 10^6$ células / ml). Los valores del número de epimastigotes presentados corresponden a los promedios de tres diferentes curvas de crecimiento; las barras de error son las desviaciones estándar.

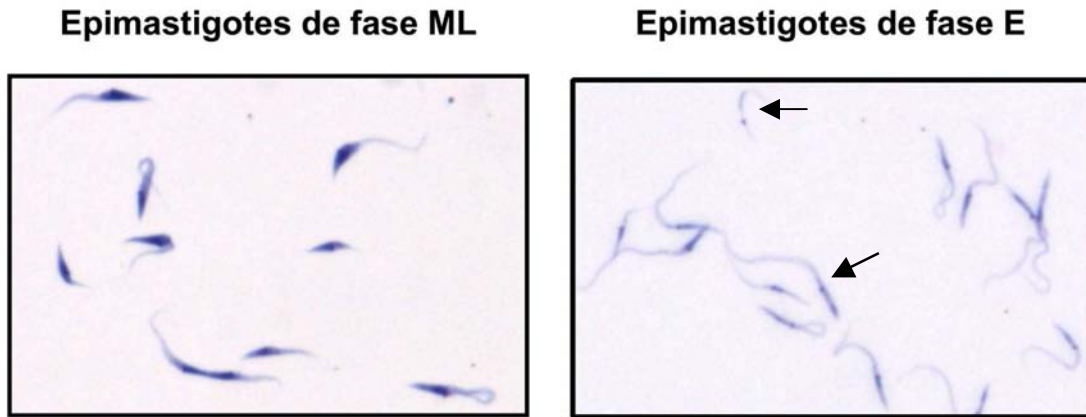


Figura 10. Epimastigotes de fase ML y fase E teñidos con HEMA3. Micrografías, aumento 60X. En la muestra de epimastigotes de fase E se indican con flechas dos formas intermedias, una en la que se puede apreciar un distanciamiento entre el núcleo y el cinetoplasto, y otra en la que el cinetoplasto se encuentra en el extremo posterior de la célula.

Los sobrenadantes de cultivos de fibroblastos infectados con *T. cruzi* fueron una buena fuente de los estadios tripomastigote (sanguíneo) y amastigote. En la figura 11 se presentan tinciones con HEMA3 de tripomastigotes y amastigotes del sobrenadante de una infección de 12 días, separados con el anticuerpo monoclonal 2B. En la muestra de tripomastigotes puede quedar una contaminación < 5 % de amastigotes, y en la muestra de amastigotes una contaminación del 1 - 5 % de tripomastigotes que quedan atrapados entre los agregados de amastigotes (Figura 11, Amastigotes).

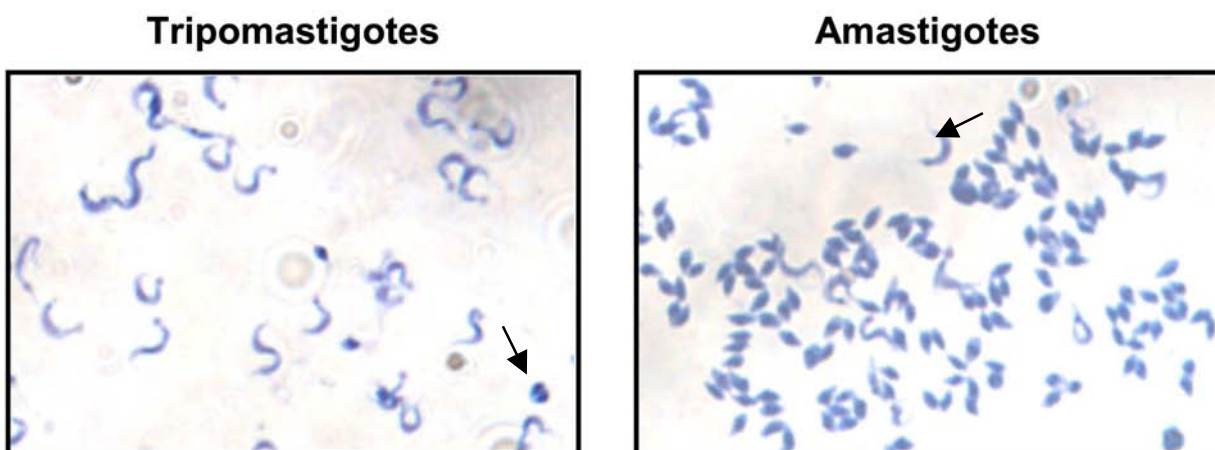


Figura 11. Fracciones de tripomastigotes y amastigotes teñidos con HEMA3. Micrografías, aumento 60X. En las imágenes se señala con una flecha uno de los pocos amastigotes o tripomastigotes “contaminantes”.

8.3 Caracterización del suero policlonal contra la proteína recombinante GST-actina de *T. cruzi*.

Una herramienta clave para la realización del presente trabajo fue el suero policlonal de conejo contra la proteína recombinante GST-actina de *T. cruzi* (Apéndice 2).

Para demostrar que la proteína recombinante - que migra con un tamaño de ~ 68 kDa - contiene actina, se determinó su reactividad con un anticuerpo comercial de conejo anti-actina generado contra los 11 residuos carboxilo terminales altamente conservados de las actinas de mamíferos (Figura 12 A). El anticuerpo comercial sí reconoce a la proteína recombinante, y también, reconoce una proteína de 43k Da en lisados totales de *T. cruzi*, tamaño consistente con la masa molecular que se predice de la secuencia de aminoácidos de actina de *T. cruzi*, y con el tamaño reportado para actina de *T. cruzi* por Mortara (1989). Sin embargo, ésta reactividad es menos intensa al compararla con la observada en la actina nativa de las células humanas HeLa, considerando que en el ensayo se han cargado las mismas cantidades de proteínas totales (Figura 12 B). Es posible que esto se deba a que actina es más abundante en las células de eucariontes superiores que en *T. cruzi*.

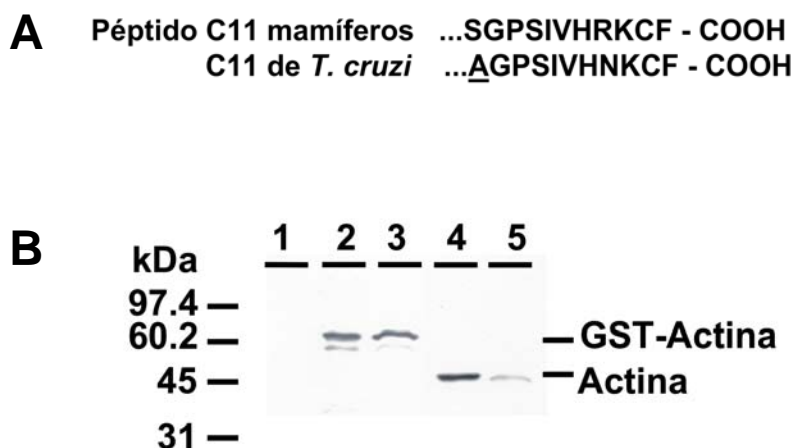


Figura 12. A) Secuencia de residuos de aminoácidos del fragmento carboxilo terminal de actina de mamíferos contra el cual se desarrolló el anticuerpo comercial, debajo de la secuencia se indican los aminoácidos correspondientes a la actina de *T. cruzi*. El único residuo aminoácido diferente es el primero: la A subrayada. **B)** *Western blot*. Reactividad de un anticuerpo heterólogo anti-actina comercial en: 1. Lisados totales de cultivo de *E. coli* no inducido. 2. Lisados totales de cultivo de *E. coli* inducido con IPTG. 3. Proteína recombinante GST-Actina eluida. 4. Lisados totales de células HeLa. 5. Lisados totales de epimastigotes de *T. cruzi*.

El suero policlonal obtenido al inmunizar un conejo con GST-actina de *T. cruzi*, reconoce a la proteína recombinante, y reacciona fuertemente con una banda de 43 kDa en lisados totales de epimastigotes de *T. cruzi* (Figura 13). Este resultado coincide con el tamaño de la proteína identificada con el anticuerpo heterólogo anti-actina comercial.

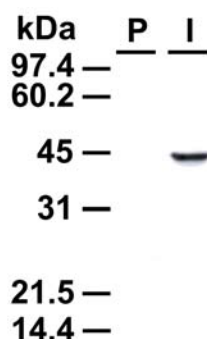


Figura 13. Detección de actina en lisados totales de *T. cruzi*. *Western blot* de lisados totales de epimastigotes de *T. cruzi* con el suero pre-inmune (P) y con el suero anti actina recombinante de *T. cruzi*.

La reactividad del suero anti actina recombinante de *T. cruzi* con actina no es especie específica, ya que presenta reactividad cruzada con las actinas de los parásitos (Figura 14 A, Tabla 7): *Leishmania mexicana*, *T. gondii* y *T. vaginalis*, y de células de mamíferos, células NIH3T3 (Figura 14 B). Esta reactividad cruzada del suero es menor a la mostrada en los lisados de *T. cruzi* (Figura 14). En *T. vaginalis*, se reconocen dos bandas, que podrían corresponder a otras actinas reportadas en este organismo (Brugerolle, 1996).

Tabla 7. Actinas de las células con las que se probó la reactividad cruzada del suero policlonal contra actina recombinante de *T. cruzi*.

| Organismo: | Tamaño: | Referencia: | % identidad y similitud con la actina de <i>T. cruzi</i> : |
|--|-----------------|----------------------------------|--|
| <i>L. mexicana</i> | 376 aa, 43 kDa | Mortara, 1988 | ~88.6% idénticas, ~98.1% similares. * |
| <i>T. gondii</i> | 376 aa, 43 kDa. | Dobrowolski <i>et al.</i> , 1997 | 74% idénticas, 88.6% similares |
| <i>T. vaginalis</i> | 376 aa, 42 kDa | Brugerolle <i>et al.</i> , 1996 | 68.5% idénticas, 86.8% similares |
| Células de mamíferos (actina citoplásmica) | 375 aa, 42 kDa | Alberts <i>et al.</i> , 2002 | 71.2% idénticas, 91.2% similares |

Los porcentajes de identidad y similitud entre las actinas se obtuvieron con el programa LALIGN.

* Dado que no hay secuencia de actina de esta especie, se comparó con la secuencia de actina de *L. donovani*.

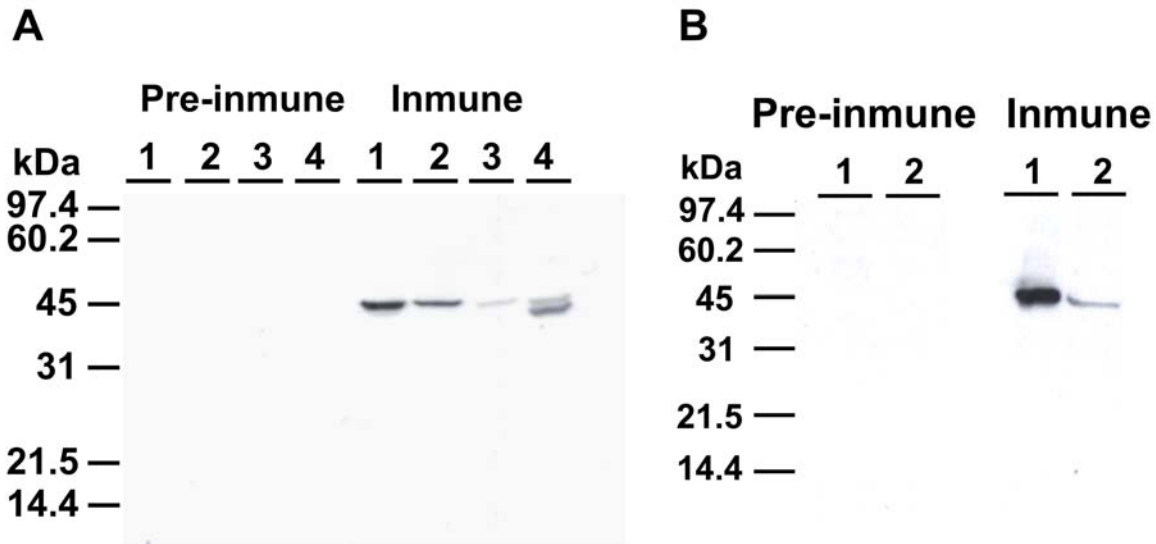


Figura 14. A) Reactividad del suero anti actina recombinante de *T. cruzi* con otros protozoarios. *Western blot* con el suero pre-inmune y suero inmune. Carril 1, lisados de *T. cruzi*; carril 2, lisados de *L. mexicana*; carril 3, lisados de *T. gondii*; carril 4, lisados de *T. vaginalis*. **B)** Reactividad con células NIH3T3. *Western blot* con el suero inmune y suero pre-inmune. Carril 1, lisados totales de *T. cruzi*; Carril 2, lisados totales de células NIH3T3.

La reactividad del suero con células NIH3T3 es mínima comparada con la de *T. cruzi* a pesar de que los fibroblastos contienen más actina (Figura 14 B). Las diferencias entre las dos proteínas deben ser una razón de la distinta afinidad del suero. Dado que el modelo de infección con *T. cruzi* se montó en NIH3T3, este resultado nos indicó la posibilidad de utilizar el suero para inmunolocalizar la actina de parásitos intracelulares sin tener mucha interferencia de la señal de la actina de la célula huésped.

8.4 Solubilidad de actina de *T. cruzi* al tratamiento con Tritón X-100.

En las células de metazoarios, una fracción importante del total de actina se encuentra en forma polimerizada formando parte del citoesqueleto. Esta fracción es resistente a la solubilización por el tratamiento con Tritón X-100. Contrariamente, en algunos protozoarios se ha demostrado que mantienen un gran pool de actina soluble (actina en su forma globular), por ejemplo en los apicomplexos *T. gondii* y *Plasmodium* (Dobrowsky *et al.*, 1997; Poupel y Tardieux, 1999; Schmitz, 2005), y en el tripanosomátido

Leishmania, en el cual cerca del 70 % de actina se encuentra en la fracción soluble (Sahasrabudde *et al*, 2004). Mortara (1989) reportó que en los tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* actina era retenida en la fracción insoluble. Para determinar la solubilidad de actina en epimastigotes de *T. cruzi*, se trataron los parásitos con Tritón X-100 y se obtuvieron las fracciones soluble e insoluble por centrifugación. Para detectar actina en las fracciones se hizo un ensayo *western blot* usando el suero policlonal. Los resultados indican que la mayor parte de la actina fue soluble al detergente, indicando que ésta podría encontrarse mayoritariamente en su forma monomérica o en filamentos cortos como los descritos en otros parásitos (Figura 15). En este mismo ensayo, se detectó tubulina usando un anticuerpo heterólogo como un control del procedimiento. Y como era de esperarse, contrario a actina, la mayor cantidad de la proteína tubulina, que se encuentra mayoritariamente estructurada en microtúbulos (Gull, 1999), se detectó en la fracción insoluble.

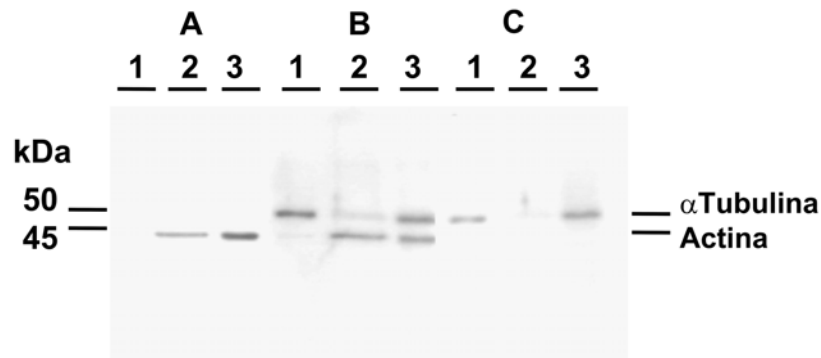


Figura 15. Fracciones soluble e insoluble en Tritón X-100 de actina y α tubulina (control) de *T. cruzi*. *Western blot* con el suero anti actina recombinante de *T. cruzi* (panel A), anticuerpos anti α tubulina de ratón (panel C) y ambos (panel B). Carril 1, fracción insoluble; carril 2, fracción soluble; carril 3, lisados totales de *T. cruzi*

8.5 Presencia y localización de actina en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

De Souza *et al* (1983) y Mortara (1989) demostraron la presencia de la proteína actina en el estadio epimastigote. En el presente trabajo, mediante ensayos *western blot*, la presencia de la proteína fue demostrada en diversos estadios de *T. cruzi*: epimastigotes de fase ML y fase E, tripomastigotes y amastigotes. Posteriormente, considerando que: 1) *T. cruzi* presenta cambios morfológicos importantes durante su ciclo de vida; 2) la reorganización de su citoesqueleto basado en tubulina de un estadio a otro es muy evidente (Gull *et al.*, 1999); y 3) es probable que la localización de actina también presente una reorganización acompañada de cambios funcionales dependientes de esta proteína; se analizó la distribución subcelular de la proteína mediante microscopía confocal en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

8.5.1 Actina en epimastigotes de la fase media logarítmica y la fase estacionaria de la curva de crecimiento en cultivos axénicos.

Se comenta que en la fase estacionaria de la curva de crecimiento de epimastigotes se mimetiza el estrés nutricional que el parásito experimenta durante el crecimiento *in vivo* en la cloaca del insecto (Contreras *et al.*, 1985). El estrés nutricional en la fase estacionaria conlleva a cambios morfológicos y bioquímicos que favorecen la transformación a tripomastigotes metacíclicos (Contreras *et al.*, 1985; Henríquez *et al.*, 1993). De hecho, durante esta fase, ~5 % se diferencian espontáneamente a formas infectivas, y también pueden apreciarse forma intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes. Varios de estos cambios deben estar relacionados a la expresión diferencial y/o a la re-localización de proteínas de citoesqueleto. En un trabajo previo, se determinó que la concentración de ARNm de actina llegaba a niveles mínimos en la fase estacionaria (Cevallos *et al.*, 2003); sin embargo, este ARNm era más estable en la fase estacionaria que en la fase media logarítmica (Cevallos *et al.*, 2005). Era de nuestro interés determinar qué comportamiento tenían la proteína actina, a nivel de cantidad y localización, en las dos fases. Para éste fin, primero, se realizó un ensayo *western blot* usando el suero policlonal contra la actina recombinante de *T. cruzi* para detectar la proteína en lisados totales de epimastigotes de fase ML y fase E (Figura 16). Se empleó

como control de carga la detección de tubulina. Puede observarse que no hay variaciones importantes en la cantidad de actina entre los epimastigotes de las dos fases (Figura 16).

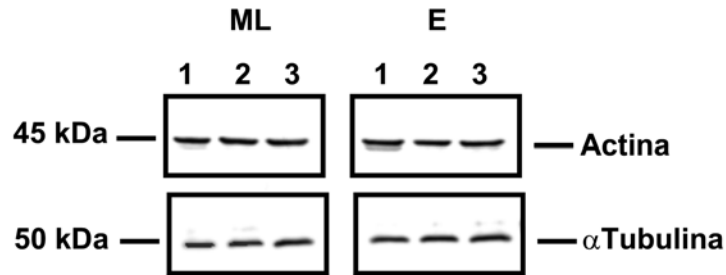


Figura 16. Detección de actina y α tubulina (como control de carga) en lisados totales de epimastigotes de *T. cruzi*. A) *Western blot* con el suero anti actina recombinante de *T. cruzi*; y con anticuerpos anti α tubulina de ratón. Lisados de epimastigotes de fase logarítmica provenientes de tres diferentes cultivos: cultivo 1 (carril 1), cultivo 2 (carril 2) y cultivo 3 (carril 3).

La distribución de actina en los epimastigotes de fase ML y E se determinó con Microscopía Confocal. En estos parásitos, la proteína se distribuye difusamente a lo largo de la célula. De manera interesante, se encontró en concentraciones en la región cercana al cinetoplasto y en varias regiones del flagelo (Figura 17). También se llegaron a observar concentraciones adicionales en parásitos aislados, como en la región entre el cinetoplasto y el núcleo, y en la región posterior al núcleo (Figura 17). Esta misma distribución subcelular es observada en los epimastigotes de fase E (Figura 18).

Figura 17. Inmunotinción de actina de epimastigotes de *T. cruzi* de fase media logarítmica (ML) con el suero anti actina recombinante de *T. cruzi*. Pre-inmune: micrografías de células controles, epimastigotes teñidos con el suero pre-inmune. Inmune: ejemplos de micrografías de epimastigotes teñidos con el suero inmune. Señal verde: Actina. Señal roja: Ioduro de propidio que tiñe ADN, observamos el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos. Las imágenes a, b, e y f, son micrografías tomadas con el canal de luz, a todas las demás, éste se les ha quitado. 100X, zoom 1; 100X, zoom 2.

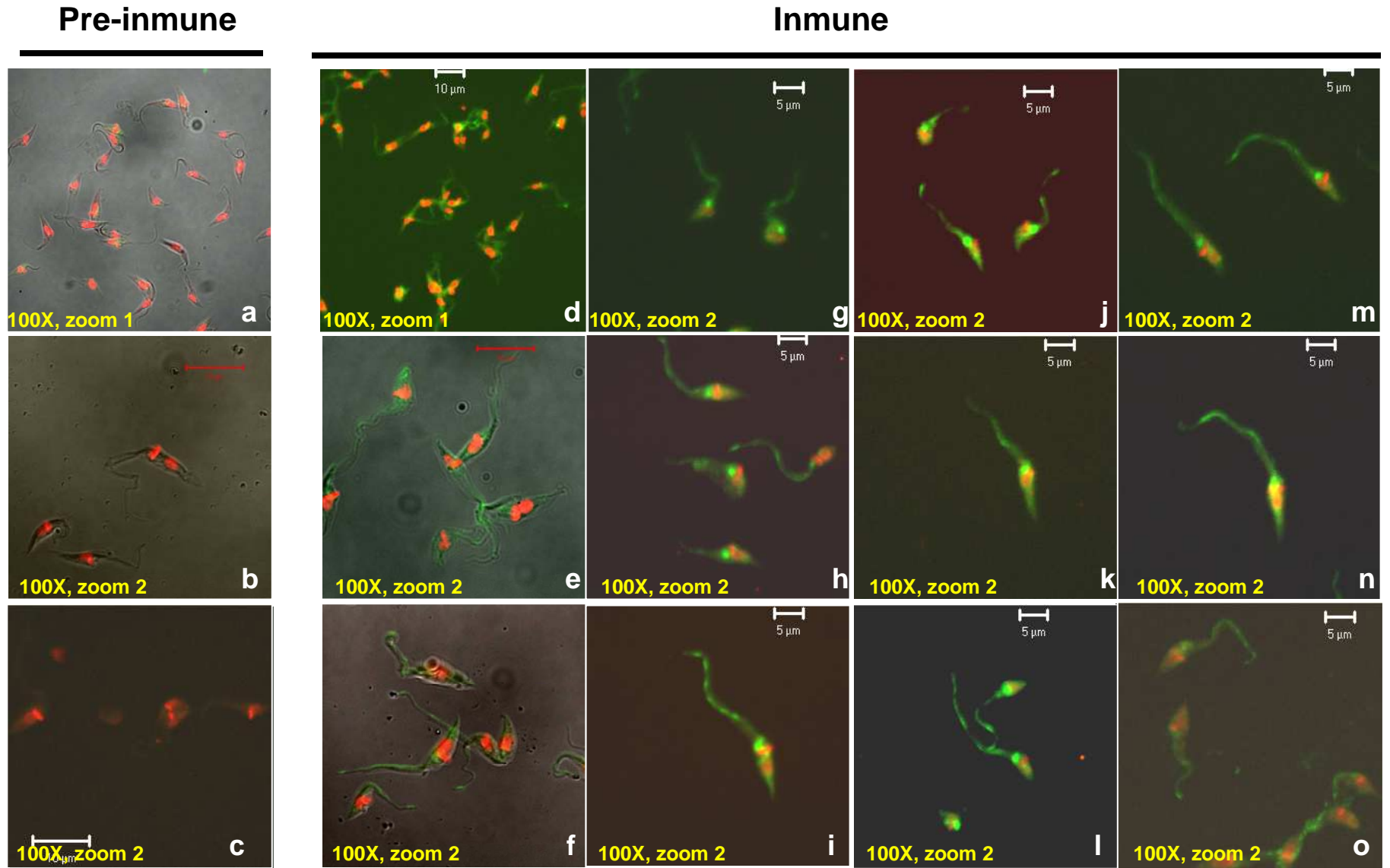
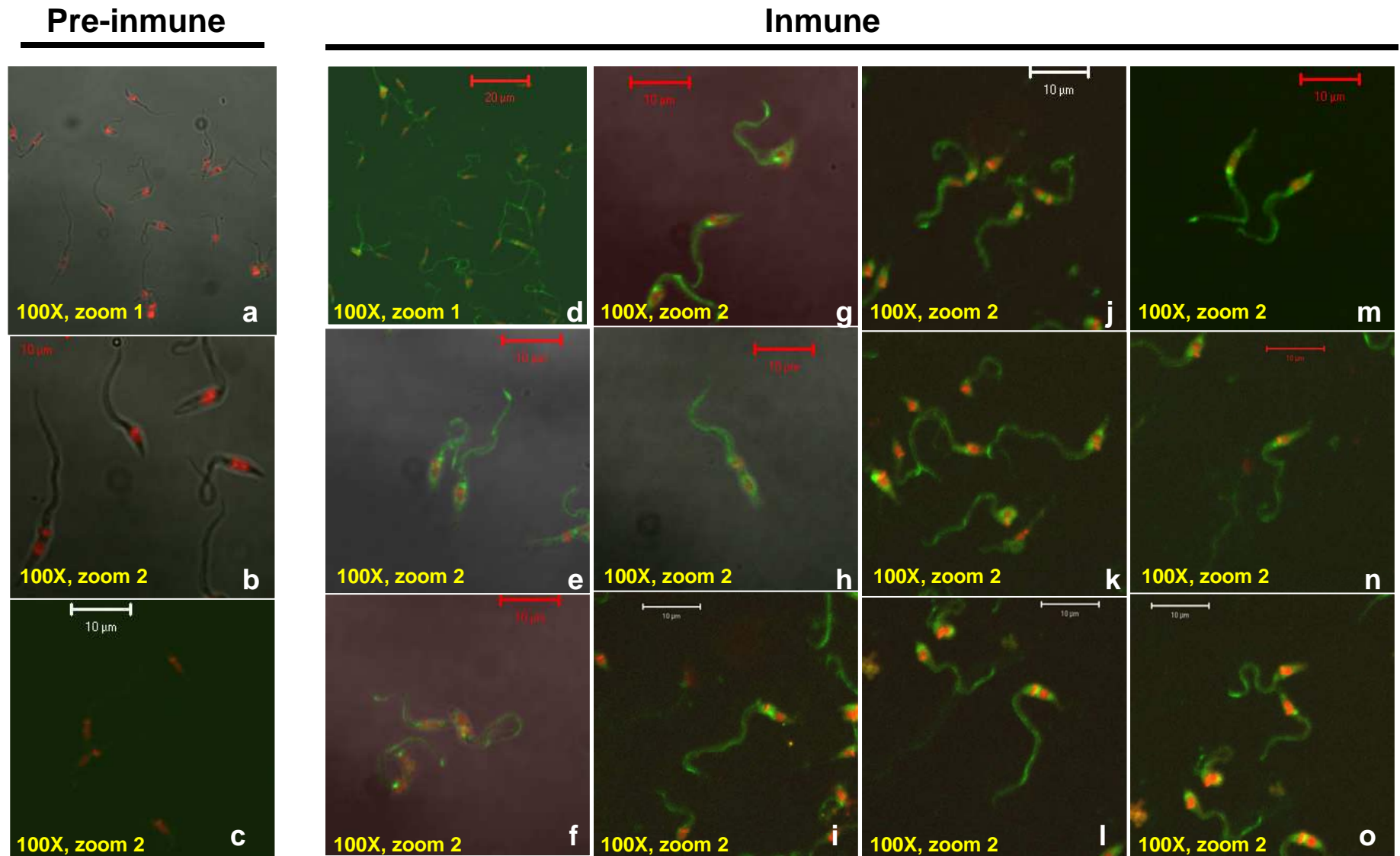


Figura 18. Inmunotinción de actina de epimastigotes de *T. cruzi* de fase estacionaria (E) con el suero anti actina recombinante de *T. cruzi*. Pre-inmune: micrografías de células controles, epimastigotes de fase E teñidos con el suero pre-inmune. Inmune: micrografías de epimastigotes de fase E teñidos con el suero inmune; pueden apreciarse algunas formas intermedias (h, m y n). Nótese la señal de actina en la punta del flagelo de varias células. Señal verde: actina. Señal roja: ADN, observamos el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos. Las imágenes a, b, e, f, g y h son micrografías tomadas con el canal de luz.



8.5.2 Presencia y localización de actina en los estadios amastigote y tripomastigote.

Dado que los estudios de expresión y localización de la proteína actina se limitan al estadio epimastigote (De Souza *et al.*, 1983; Mortara 1989), era importante determinar su situación en los otros estadios de *T. cruzi*. Para determinar la expresión de actina en los amastigotes y tripomastigotes, se realizaron ensayos *western blot* usando el suero policlonal contra actina recombinante de *T. cruzi*. Como control de carga se detectó tubulina. El suero contra actina reconoce, al igual que en los epimastigotes, una banda de 43 kDa en lisados totales de tripomastigotes y amastigotes (Figura 19), indicándonos que la proteína es expresada en los tres estadios de desarrollo de *T. cruzi*.

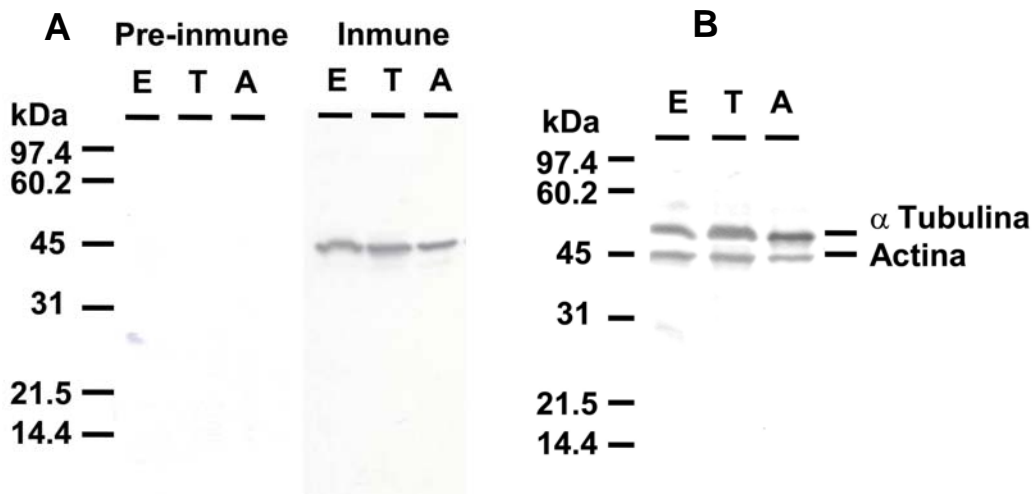


Figura 19. Detección de actina (Panel A), y de actina junto con α tubulina (como control de carga) en lisados totales de epimastigotes (E), tripomastigote (T) y amastigotes (A) de *T. cruzi*. *Western blot* con el suero anti actina recombinante de *T. cruzi*; y con anticuerpos anti α tubulina de ratón.

a) Localización de actina en tripomastigotes liberados al sobrenadante de fibroblastos en cultivo infectados con *T. cruzi*.

En los tripomastigotes, la distribución de actina fue difusa a través de toda la célula y el flagelo (Figura 20). En ninguno de los estudios realizados fue posible identificar áreas de focalización. La intensidad de la señal de actina en tripomastigotes pareció ser mínima al compararla con la observada en epimastigotes y amastigotes.

b) Localización de actina en amastigotes liberados al sobrenadante de fibroblastos en cultivo infectados con *T. cruzi*.

En la población de amastigotes liberados al sobrenadante se observó heterogeneidad en la concentración celular (intensidad de la señal de actina) o en su distribución subcelular: actina puede encontrarse de manera difusa o concentrada a través de toda la célula, concentrada en las regiones anterior o posterior al núcleo, o en la periferia de la célula dando una señal cortical (Figura 21).

c) Localización de actina en parásitos intracelulares.

Se inmunolocalizó la proteína actina en parásitos intracelulares de fibroblastos infectados. Se observó que independientemente de la carga de amastigotes en el interior de los fibroblastos (se observaron fibroblastos con pocos amastigotes en su interior u otros infestados de parásitos), la intensidad de la señal y localización de actina fue heterogénea en la población de parásitos, presentando patrones de la señal de actina muy parecidos a los observados en la población de amastigotes extracelulares (Figura 22). En las muestras de infecciones, se apreciaron algunos fibroblastos conteniendo formas intermedias de desarrollo (entre amastigotes y tripomastigotes) cuya morfología es parecida a amastigotes pero presentan un flagelo ya sea corto o largo. En estas formas intermedias, se observó una tinción de actina intensa en todo el cuerpo celular y a lo largo del flagelo (Figura 23). También se observaron otras formas intermedias morfológicamente más cercanas a los tripomastigotes, las cuales presentaron un patrón difuso de señal de actina (Figura 24).

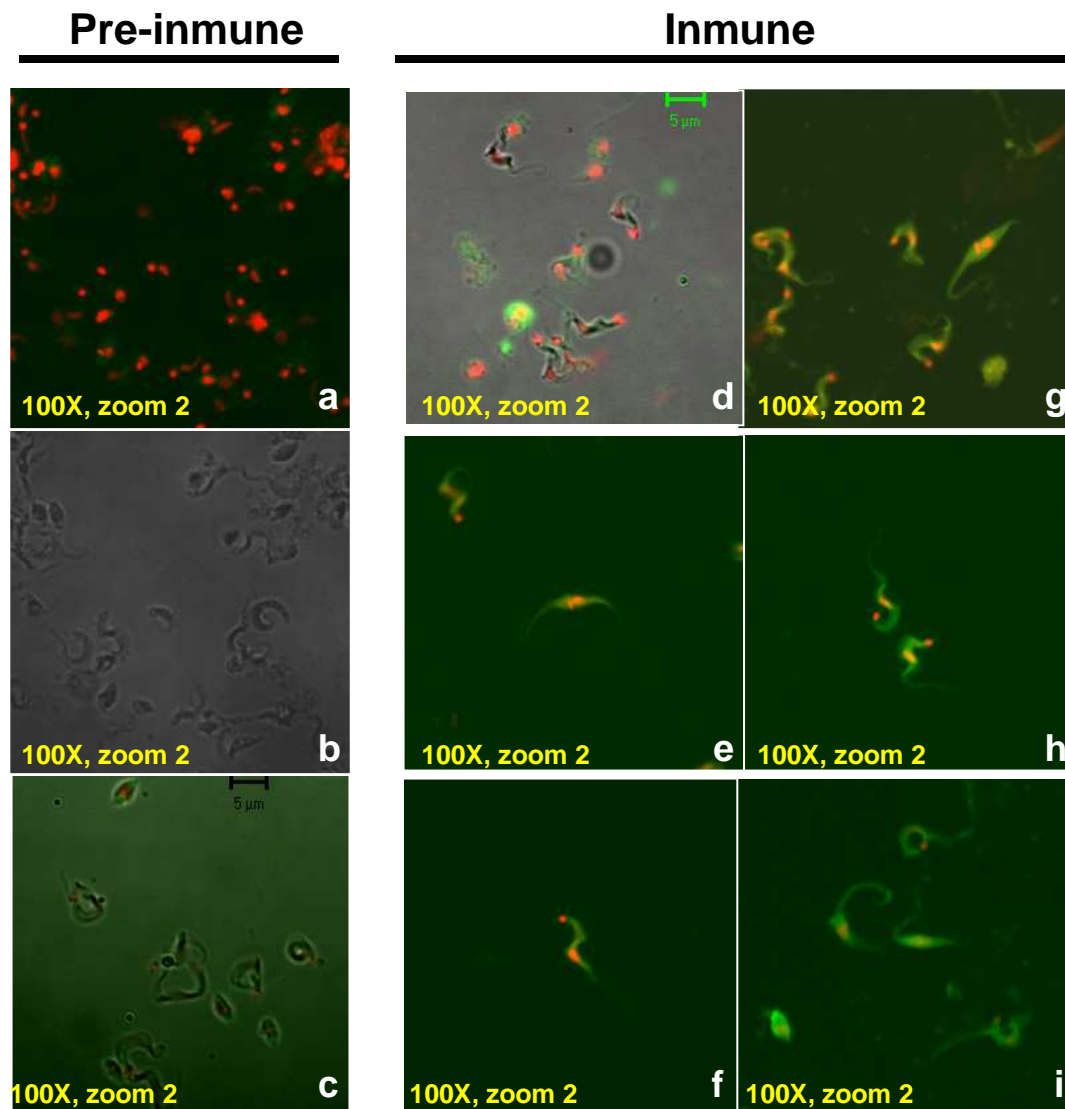


Figura 20. Inmunotinción de actina de tripomastigotes sanguíneos liberados al sobrenadante de fibroblastos en cultivo infectados con *T. cruzi* con el suero anti actina recombinante de *T. cruzi*. Pre-inmune: micrografías de tripomastigotes teñidos con el suero pre-inmune como control. Inmune: micrografías de tripomastigotes teñidos con el suero inmune. Se observa que la señal es difusa y homogénea a través de las células, no hay concentraciones. Señal verde: actina. Señal roja: ADN, observamos el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos. Las imágenes b (misma que a), c y d son micrografías tomadas con el canal de luz.

Figura 21. Inmuntocinión de actina de amastigotes liberados al sobrenadante de fibroblastos en cultivo infectados con *T. cruzi* con el suero anti actina recombinante de *T. cruzi*. Pre-inmune: amastigotes teñidos con el suero pre-inmune como control. Inmune: micrografías de amastigotes teñidos con el suero inmune; pueden apreciarse la heterogeneidad en la señal y localización de actina en la población de amastigotes. Señal verde: actina. Señal roja: ADN, observamos el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos. Las imágenes a, b, k y m son micrografías tomadas con el canal de luz. Las micrografías j e i son las mismas imágenes de k y m pero sin el canal de luz ni el canal rojo, por lo que únicamente se aprecia la señal de actina.

Pre-inmune

Inmune

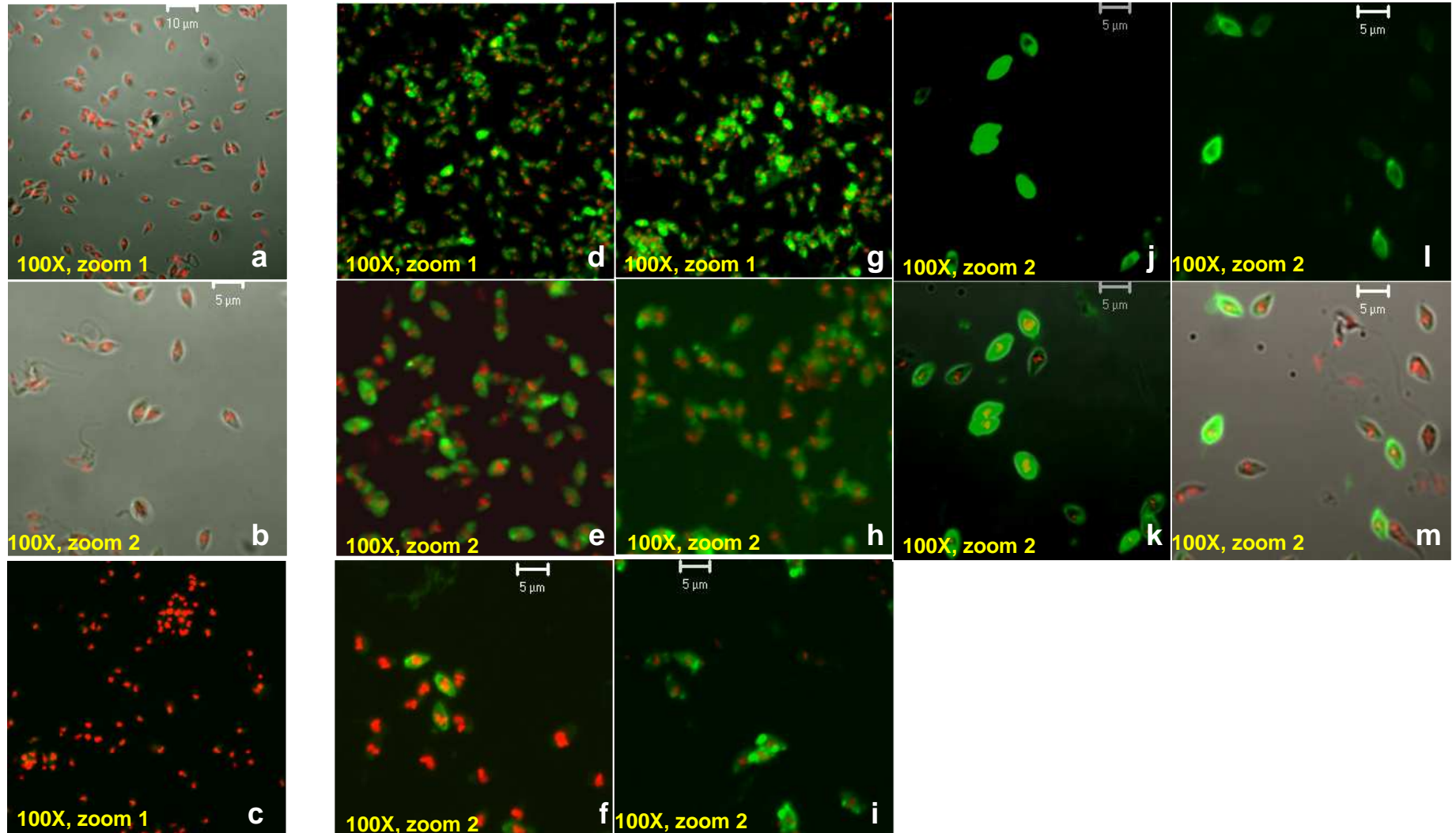
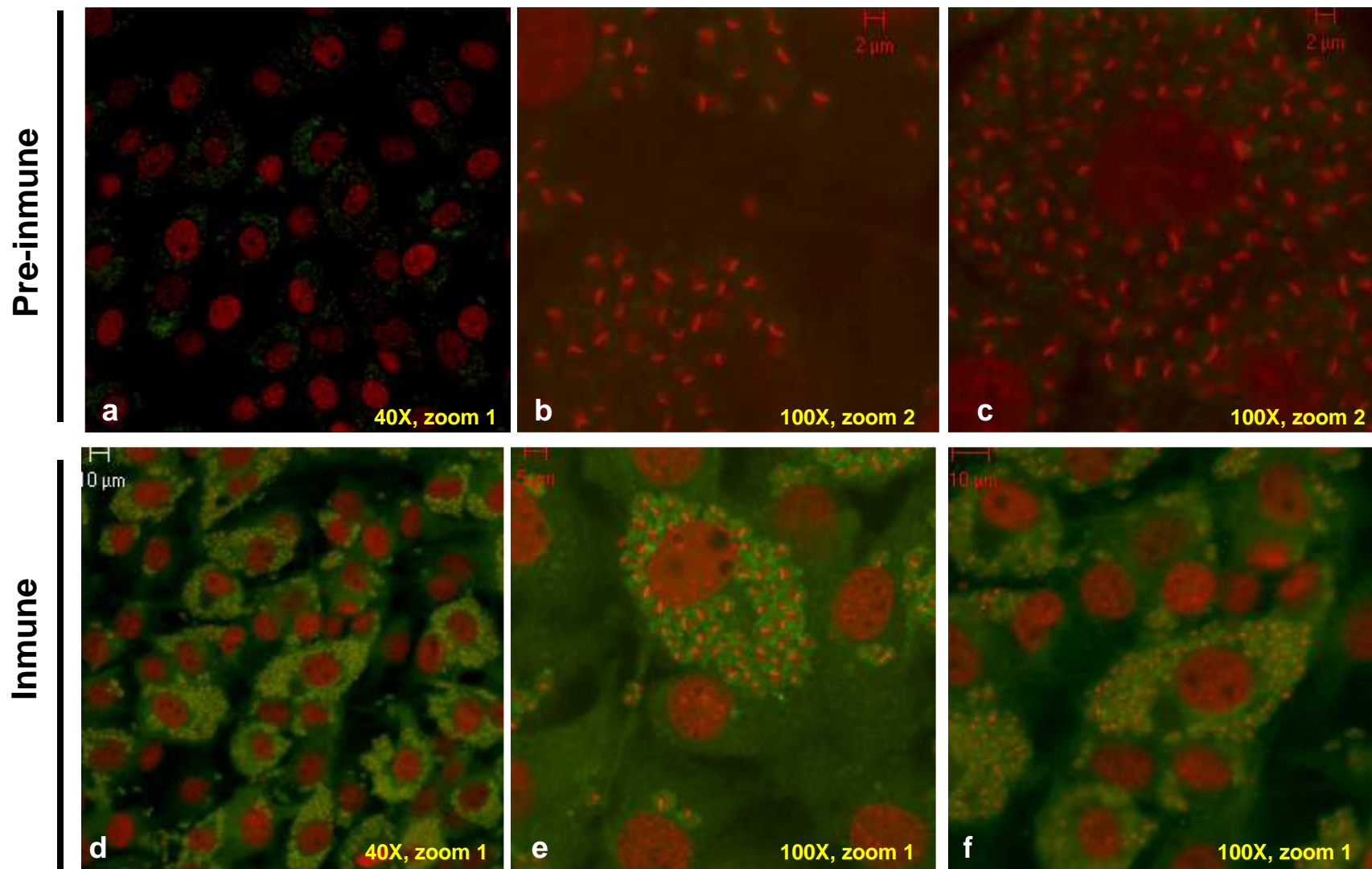


Figura 22. Inmunotinción de actina de amastigotes intracelulares de *T. cruzi* en fibroblastos infectados. Pre-inmune: amastigotes teñidos con el suero pre-inmune como control. Inmune: micrografías de amastigotes teñidos con el suero inmune contra actina recombinante de *T. cruzi*. Señal verde: actina. Señal roja: ADN, observamos el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos, y el núcleo de los fibroblastos. La señal y distribución de actina en la población de amastigotes es heterogénea. Se aprecia una ligera reacción cruzada con la actina de los fibroblastos. Todas las micrografías se tomaron sin el canal de luz. En la siguiente página se presentan más imágenes de la reacción inmune, imágenes g – l.



Inmune

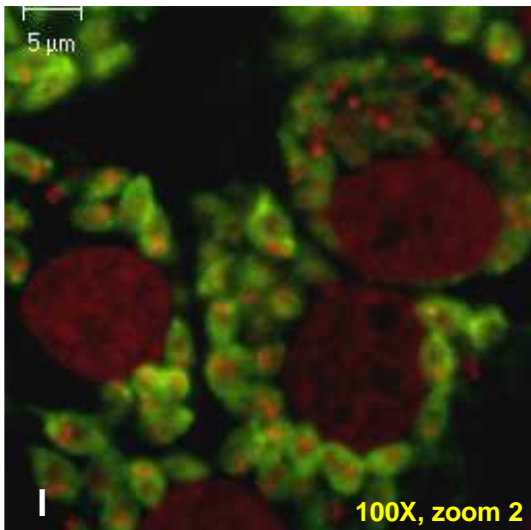
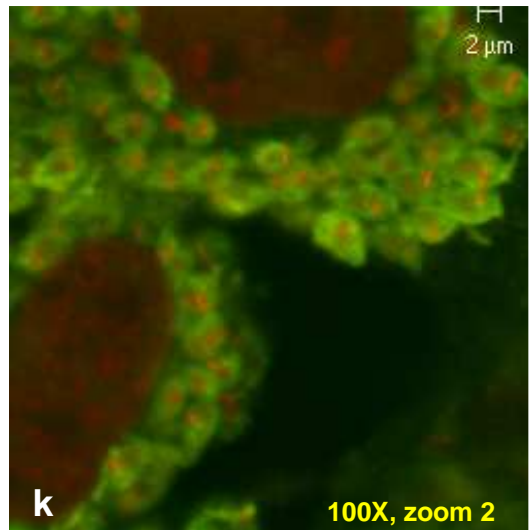
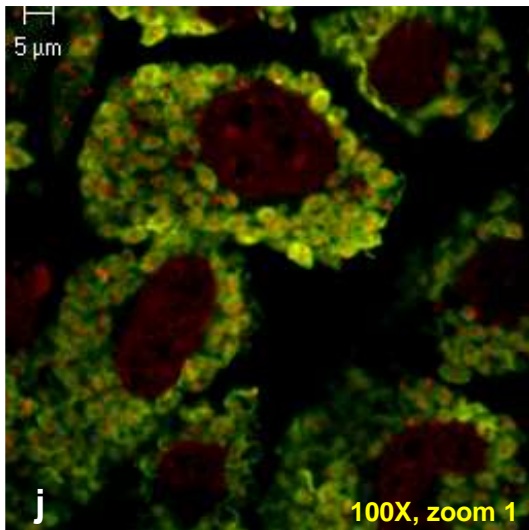
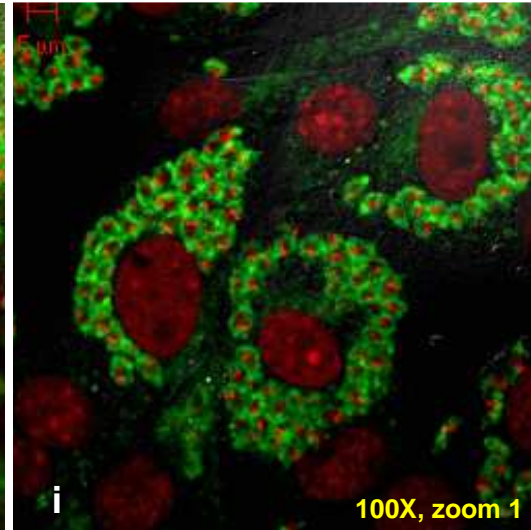
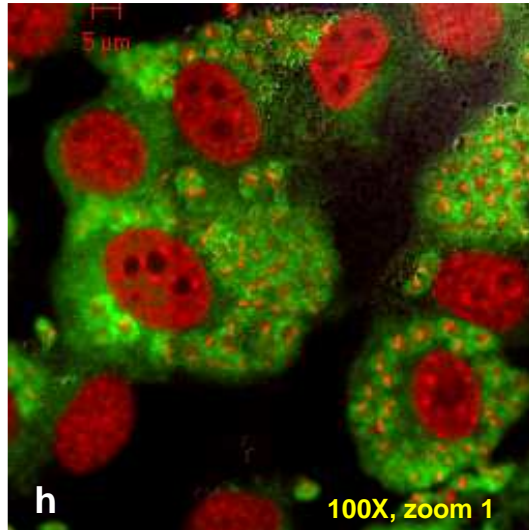
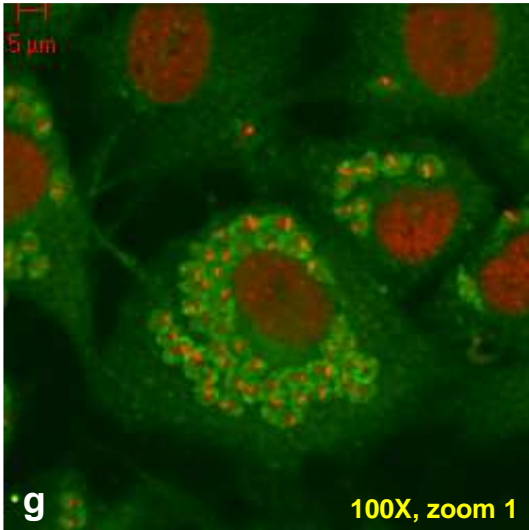


Figura 23. Inmunotinción de actina de formas intermedias amastigote-tripomastigote flageladas intracelulares de *T. cruzi* de fibroblastos infectados (flechas). Son micrografías de amastigotes teñidos con el suero inmune contra actina recombinante de *T. cruzi* (señal verde) tomadas sin el canal de luz. La señal roja corresponde al ADN, observándose el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos, y el núcleo de los fibroblastos. Las formas intermedias presentan una señal de actina intensa a través del cuerpo celular y el flagelo.

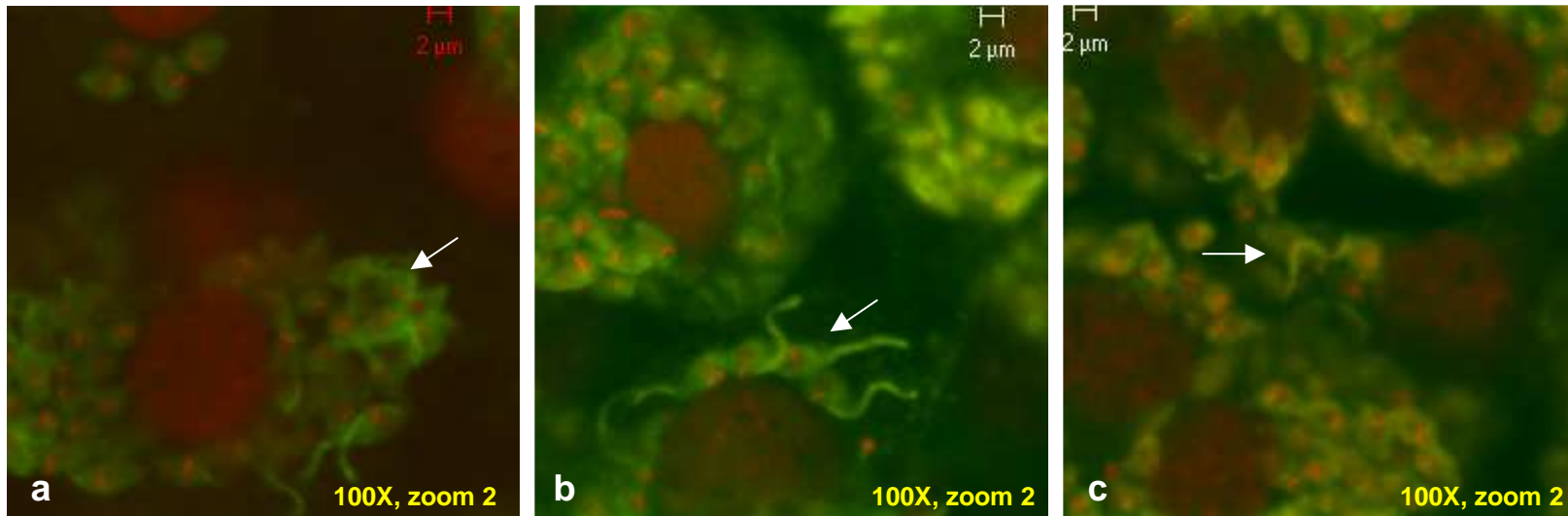
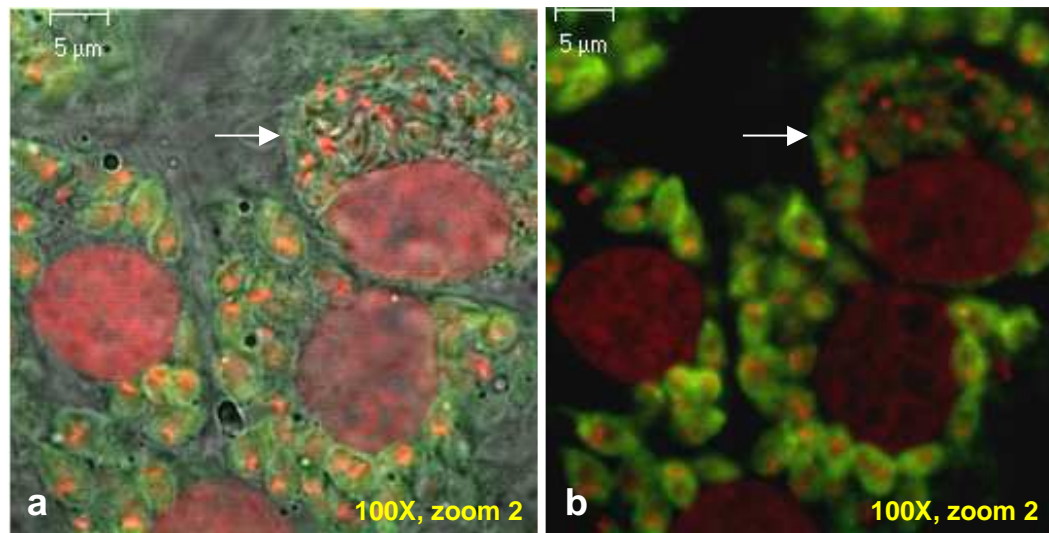


Figura 24. Inmunotinción de actina de formas intermedias intracelulares con morfología cercana a tripomastigotes (flechas) en un fibroblasto infectado (flecha). Son micrografías de amastigotes teñidos con el suero inmune contra actina recombinante de *T. cruzi* (señal verde). La señal roja corresponde al ADN, observándose el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos, y el núcleo de los fibroblastos. La micrografía a y b son las misma imagen, solo que a se tomó con el canal de luz, apreciándose la silueta de los parásitos, y b sin el canal de luz. Se aprecia una señal difusa de actina a través de todo el parásito.



9. DISCUSIÓN.

En los eucariontes, actina es considerada una de las proteínas más conservadas y el principal constituyente del citoesqueleto. Sin embargo, en los eucariontes de divergencia temprana de la familia *Trypanosomatidae* como *T. cruzi*, el citoesqueleto está formado principalmente por un sistema de tubulina. En *T. cruzi* el citoesqueleto de tubulina ha sido ampliamente caracterizado (Gull, 1999). Contrariamente, son escasos los datos referentes a actina en este organismo. Se conoce que el gen de actina está conservado en *T. cruzi*, y unos cuantos estudios han sugerido la presencia de la proteína en uno de los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*, en el epimastigote (De Souza *et al.*, 1983; Mortara 1989; Cevallos *et al.*, 2003). Dado que en *T. cruzi* no se han podido identificar los típicos filamentos de actina de 5-7 nm (Mortara, 1989), se ha sugerido que su actina tiene propiedades estructurales y de ensamblaje peculiares. De Souza *et al* (1983) y Mortara (1989) inmunolocalizaron a actina en epimastigotes a través de microscopía de epifluorescencia y anticuerpos heterólogos. Ésta presentó una distribución difusa a través de todo el cuerpo celular; sin embargo, De Souza *et al* (1983) reportan una reactividad primordialmente flagelar, mientras que Mortara (1989) no, debido quizás a la distinta reactividad de los anticuerpos usados en cada estudio. Considerando que con el uso de anticuerpos homólogos pueden resolverse estas diferencias, en este trabajo se empleó un suero policlonal contra una proteína recombinante GST-actina de *T. cruzi* para determinar la presencia y tener un mayor detalle de la localización de actina en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

El suero policlonal reconoció a la proteína actina (43 kDa) en los tres estadios de *T. cruzi*. Los ensayos *western blot* sugieren que no hay diferencias importantes en la cantidad de actina entre los epimastigotes de fase media logarítmica y estacionaria, y ni entre los estadios epimastigote, tripomastigote y amastigote.

La alta conservación de la secuencia de actina entre las especies se refleja en la reactividad no especie específica del suero policlonal, ya que éste también reconoció la actina de los protozoarios *Leishmania mexicana*, *Toxoplasma gondii*, y *Trichomonas vaginalis*, y células de mamíferos. Sin embargo, es evidente una afinidad menor de este

suelo con la actina de mamíferos, que contiene más residuos divergentes a los de *T. cruzi* (Tabla 7).

En epimastigotes, se demostró que actina es recuperable de la fracción soluble al detergente no iónico Tritón X-100, lo cual indica que no se organiza en los típicos filamentos como los vistos en células de eucariontes superiores o que éstos no son estables (este dato que es consistente con los intentos fallidos de localizar los típicos microfilamentos de 5 a 7 nm en *T. cruzi* ya sea con la tinción de rodamina-faloidina o con microscopía electrónica de transmisión - De Souza *et al.*, 1983; Mortara, 1989 -). En contraste a este resultado, la distribución subcelular de actina en el estadio tripomastigote metacíclico de *T. cruzi* reportada por Mortara (1989) indica que la proteína es retenida en la fracción insoluble al detergente no iónico Nonidet-P40, en la fracción citoesquelética. Considerando que en *T. cruzi* actina no se organiza en los típicos arreglos de microfilamentos, es intrigante saber de qué manera está estructurada ésta proteína en este estadio. Se ha sugerido que la ausencia o inestabilidad de típicos filamentos de actina en *T. cruzi* son propiedades intrínsecas de la proteína del parásito (dado que sus regiones menos conservadas están en la superficie de la proteína y podría tener propiedades peculiares de polimerización y/o interacción con otras proteínas) y/o al conjunto de proteínas de unión a actina que están encargadas de la regulación del citoesqueleto de actina en este organismo (Mortara, 1989). La secuencia del genoma de *T. cruzi* ha revelado la presencia de un conjunto remarcablemente simple de proteínas de unión a actina conocidas; las proteínas involucradas en la formación y el corte de haces y redes de actina están ausentes (Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005), lo cual puede explicar por qué no se visualizan organizaciones complejas de microfilamentos en el parásito. Por otro lado, una proteína actina 89 % idéntica a la de *T. cruzi*, la actina de *Leishmania*, polimeriza en una manera peculiar (únicamente forma oligómeros) aún en presencia de ABPs de células de mamíferos (Sahasrabudde *et al.*, 2004). Se ha sugerido que éstas propiedades se deben a las características específicas de la molécula de actina del parásito, llamando la atención las regiones menos conservadas (con respecto a las de células de eucariontes superiores), el *loop* DNasa I y el *loop* H, regiones involucradas principalmente en la polimerización (Sahasrabudde *et al.*, 2004). En la actina de *T. cruzi* éstas regiones también son las menos conservadas, con lo que se sugiere que para su función, la proteína podría estar asociándose en estructuras simples, quizás formando oligómeros de actina como los descritos en *Leishmania*.

A nivel de microscopía confocal, no se observaron estructuras filamentosas de la proteína actina en ningunos de los estadios de *T. cruzi*. En todos los estadios, actina presentó una distribución difusa a través de toda las células, sin embargo, se observaron varias concentraciones importantes en los estadios epimastigote y amastigote -en el tripomastigote no se observó ninguna concentración de la señal de actina- (Figura 25). Se desconoce si la distribución distinta de actina en los diferentes estadios celulares de *T. cruzi* indica una función diferente de esta proteína en el desarrollo del parásito. Esto tendrá que ser analizado experimentalmente.

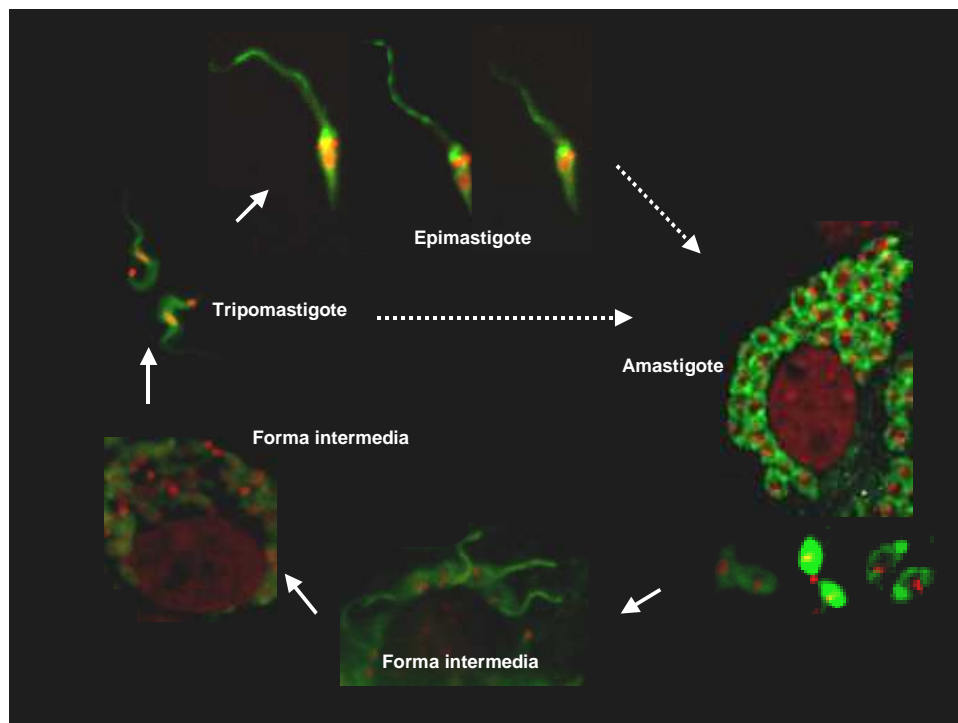


Figura 25. Localización de actina en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.

En los epimastigotes, tanto de fase media logarítmica como de estacionaria, fue observada una concentración principal de actina en la región cercana al cinetoplasto (región que contiene a las dos únicas estructuras celulares que llevan a cabo la endocitosis en *T. cruzi*, el bolsillo flagelar y el citostoma) y también formando varios parches a lo largo del flagelo. Este dato es novedoso, dado que no se apreciaron

concentraciones específicas en los estudios previos de inmunolocalización de actina en epimastigotes (De Souza *et al.*, 1983; Mortara, 1989).

En los metazoarios y algunos protozoarios, incluyendo al también tripanosomátido *T. brucei* (García-Salcedo *et al.*, 2004), actina está involucrada en la función de endocitosis. En el estadio epimastigote de *T. cruzi*, la endocitosis también parece ser una función probable de actina: el tratamiento de epimastigotes con la droga inhibidora de la polimerización de microfilamentos citocalasina B afecta el proceso de endocitosis (Bogitsh *et al.*, 1995). La observación en este trabajo de que actina está en la región celular del bolsillo flagelar en epimastigotes apoya la hipótesis de su participación en endocitosis.

Son muy pocas las referencias que asocian directamente a actina con la estructura del flagelo en células flageladas. En *Chlamydomonas* se ha demostrado que actina es una subunidad de las dineínas del axonema flagelar (es componente estructural del flagelo); también, se ha sugerido un papel de ésta en la formación flagelar, ya que es transportada y localizada en la fracción citosólica-membranal del flagelo (Hirono *et al.*, 2003). A diferencia de los promastigotes de *Leishmania*, en donde actina se localizó distribuida a lo largo del flagelo y se sugirió un posible papel estructural similar al de *Chlamydomonas* (Sahasrabudhe *et al.*, 2004), la actina de *T. cruzi* se presenta concentrada en forma de estructuras tipo parches a diferentes niveles del flagelo y/o en la punta de esta estructura. En metazoarios, los parches de actina son estructuras altamente dinámicas, movibles, que se forman en sitios de crecimiento celular activo y en los sitios de endocitosis (Mulholland *et al.*, 1994). En *T. cruzi* hay evidencia indirecta de un papel de actina en adherencia: la evidencia de una función conservada de la GTPasa pequeña TcRho1 (las proteínas Rho son importantes reguladores del citoesqueleto de actina en metazoarios) en la regulación de la adhesión de epimastigotes a través del flagelo a substratos, proceso importante para la Metaciclologénesis (De Melo *et al.*, 2006). También, en el flagelo de epimastigotes adheridos se han descrito proyecciones tipo filopodio y estructuras tipo hemidesmosoma (Bonaldo *et al.*, 1988; Kollien *et al.*, 1998), estructuras que en células de metazoarios involucran a actina. Basado en nuestros resultados no es posible establecer el papel funcional de actina flagelar. Sin embargo, se proponen tres escenarios posibles para la presencia de concentraciones de actina en el flagelo: a) pudiera tener un papel en el acortamiento-alargamiento flagelar; ya que el flagelo del epimastigote es una estructura cuya longitud cambia según las condiciones ambientales a

las que se exponga el parásito, por ejemplo, la longitud de éste aumenta al exponerse los epimastigotes a condiciones de estrés nutricional (Tyler y Engman, 2000). b) Tiene un papel en la adhesión; se pensaría que la presencia de concentraciones de actina a lo largo del flagelo correspondería a un reclutamiento previo de actina al sitio en donde se formarán los focos de adhesión requeridos para que el parásito se pegue. Sin embargo, dado que la inmunolocalización de actina no se realizó en epimastigotes adheridos, realmente es difícil sugerir un papel directo de actina en la adhesión. Los resultados preliminares de ensayos de adhesión de epimastigotes demuestran que, por lo menos, éste proceso no es inhibido por la droga Citocalasina D a las concentraciones 1 μM , 3 μM , 6 μM y 12 μM (Apéndice 8); será importante probar otras concentraciones de la droga o emplear otros desestabilizadores del citoesqueleto de actina para reforzar éste resultado. Y c), su presencia no está relacionada con alguna función conocida en otros sistemas.

Tanto en la población de amastigotes intracelulares contenidos en los fibroblastos infectados como en la población de amastigotes liberados al sobrenadante (que corresponden a la misma población de amastigotes intracelulares) se observó que la intensidad de la señal y localización de actina fue heterogénea. Actina se encuentra de manera difusa o concentrada a través de toda la célula, o puede presentarse en concentraciones en la periferia de la célula, en la región posterior al cinetoplasto (que también contiene al bolsillo flagelar y al citostoma en este estadio) o en la región posterior al núcleo. En la construcción de hipótesis de trabajo se exponen las siguientes consideraciones: muchos de los amastigotes están en proceso de proliferación o diferenciación a tripomastigotes, y quizás requieren de la síntesis, captación, transporte intracelular de proteínas, que podrían requerir del citoesqueleto de actina. Un estudio proteómico sugiere un proceso de transporte vesicular más activo en el amastigote que en los demás estadios de *T. cruzi*, ya que se detectó únicamente en los amastigotes un conjunto de proteínas involucradas en este proceso, como rab1, sec23 y sec31 (Atwood III *et al.*, 2005). Considerando este dato, es probable que en los amastigotes se esté observando a través de la localización de actina, esta alta actividad en el transporte vesicular.

La señal de actina en los tripomastigotes da una distribución difusa, sin concentraciones, a través de la célula, esta señal es menor comparada con la observada en epimastigotes y amastigotes. La ausencia de concentración en la región del bolsillo

flagelar puede asociarse al estado no proliferativo del tripomastigote. Por ejemplo, en este estadio, que carece de la estructura citostoma (principal sitio de endocitosis en epimastigotes), se ha sugerido que la actividad de endocitosis podría ser escasa, ya que no requiere la captación de nutrientes de *novo* (Soares *et al.*, 1992, Mauricio de Mendonca *et al.*, 2000). En el estudio de localización y función de actina en *T. brucei*, se observó que el papel de actina en la endocitosis se restringe a las formas que tienen alta actividad de endocitosis, las formas sanguíneas; en estas células, actina co-localizó con la vía de endocitosis, en cambio, en las formas procíclicas, en las que la endocitosis no parece existir o está muy reducida, la proteína se encontró distribuida difusamente a través de la célula (García-Salcedo *et al.*, 2004). En un trabajo realizado por Rosestolato *et al.* (2002), en la tinción con rodamina-faloidina de varios tipos celulares siendo infectadas por tripomastigotes, se observó que la tinción se limitaba a las células hospedero (principalmente en el sitio de entrada del parásito), indicando que los tripomastigotes al igual que los epimastigotes no parecen formar microfilamentos durante su interacción con la célula hospedero. Será interesante determinar la localización de actina en tripomastigotes infectando células utilizando nuestro suero policlonal.

En algunos fibroblastos con mayor tiempo de infección se apreciaron formas intermedias: unas parecidas morfológicamente a amastigotes con un flagelo corto o largo, y otras morfológicamente parecidas al tripomastigote; en las primeras formas intermedias, se observó una tinción de actina intensa en todo el cuerpo y flagelo del parásito, mientras que en las segundas, el patrón de señal fue difuso en todo el parásito. Esto sugeriría que durante la transformación de amastigotes a tripomastigotes la señal de actina en el parásito disminuye conforme pasa a tripomastigote; dado que esta transformación requiere un rearrreglo de las estructuras subcelulares será interesante evaluar el papel de actina en la morfogénesis.

Y finalmente...

El citoesqueleto es una estructura específica de las células eucariontes cuyo origen se desconoce. Se ha propuesto que los genes de actina y tubulina (principales componentes del citoesqueleto) surgieron de genes precursores procariontes. El descubrimiento de FtsZ y MreB en bacterias, proteínas con estructuras y funciones parecidas a tubulina y actina, respectivamente, apoyan esta posibilidad (Shih y Rothfield,

2006). En general, los protozoarios, debido a su posición filogenética basal en la rama de los eucariontes, son los intermedios evolutivos entre bacterias y metazoarios que pueden describirnos mucho acerca de la evolución de actina y del citoesqueleto de actina desde los puntos de vista estructurales y funcionales. Se sabe que la proteína actina está presente en protozoarios ancestrales como el diplomonado *Giardia lamblia* y el parabasáido *Trichomonas vaginalis* (Hernández *et al.*, 2007; Brugerolle, 1996). El análisis filogenético de las actinas de algunos protozoarios (apicomplexos, ciliados, dinoflagelados, y tripanosomátidos) revela que a pesar de su alta conservación con las actinas convencionales de metazoarios, existen diferencias claves que están conservadas entre los protozoarios (Sahoo *et al.*, 2006). Estas diferencias se encuentran principalmente en la superficie de la proteína y al parecer conllevan a características estructurales y funcionales diferentes a las observadas en la actina de metazoarios. Por ejemplo, se han observado diferencias como el no unirse a la DNasa I y a Faloidina, tener sensibilidad diferente a drogas como Citocalasina D o Jasplakinolide, no co-polimerizar con actinas de mamíferos, tener propiedades de polimerización y estabilidad de polímeros distintas (Sahoo *et al.*, 2006). También, en estos organismos se describe un citoesqueleto de actina con muy pocos componentes. Los datos obtenidos con el estudio de la secuencia de actina de *T. cruzi* y la información respecto al citoesqueleto de actina en la secuencia del genoma (El Sayed *et al.*, 2005), coinciden con varios de estos datos. Considerando todo lo anterior, se supondrían diferencias de actina a nivel de función celular. La recopilación de datos referentes a funciones del citoesqueleto de actina reportadas en algunos protozoarios de divergencia temprana, hacen notar que en la mayoría de los protozoarios actina no tiene en sí una función esquelética (como ocurre en metazoarios), su función se da en la formación de estructuras transitorias de procesos como la endocitosis, la locomoción celular, la adhesión y la citocinesis. En este trabajo se ha mostrado que la localización de actina en *T. cruzi* es diferente en los distintos estadios de desarrollo. Las diferentes propuestas sobre su función habrán de someterse a demostración experimental.

10. CONCLUSIONES.

- El suero policlonal contra la actina recombinante de *T. cruzi* reconoce la proteína actina de *T. cruzi*. El reconocimiento no es especie-específico, ya que reconoció la proteína de otros protozoarios y de células de mamíferos.
- La proteína actina está presente en los diferentes estadios de *T. cruzi*.
- En epimastigotes, actina se encontró principalmente en la fracción celular soluble al detergente Tritón X-100, indicando que no se encuentra estructurada o sus estructuras son muy inestables, lo cual es consistente con los intentos fallidos de identificar los típicos microfilamentos de actina de 5-7 nm observados en otras células.
- La localización de actina en *T. cruzi* es diferente en los distintos estadios de desarrollo.
- En los epimastigotes, se encontró una concentración de actina en la región anterior al cinetoplasto (región que contiene el bolsillo flagelar y el citostoma, estructuras requeridas para la endocitosis) y formando varios parches a lo largo del flagelo, en ocasiones se localizó una concentración entre el cinetoplasto y el núcleo, y en la parte posterior al núcleo. En el resto de la célula actina tuvo una distribución difusa.
- A pesar de los cambios morfológicos y funcionales entre los epimastigotes de fase media logarítmica y estacionaria de la curva de crecimiento, la cantidad de proteína actina, así como su localización, es similar.
- En tripomastigotes, en donde parece haber menos cantidad de actina, la proteína presentó una distribución difusa a lo largo del cuerpo y del flagelo.

- En amastigotes intracelulares y liberados, la señal y localización de actina fue heterogénea en la población. En algunos amastigotes actina se encontró a través de toda la célula de manera difusa, en otros, concentrada a través de todo el cuerpo celular, en otras ocasiones en concentraciones en la periferia de la célula, en la región anterior al cinetoplasto (que también contiene al bolsillo flagelar y al citostoma en este estadio) o en la región posterior al núcleo.
- En las formas intermedia observadas en los fibroblastos infectados (células que parecen amastigotes con un flagelo pequeño o uno largo), la señal de actina es intensa en todo el cuerpo celular y el flagelo.
- Actina parece estar principalmente en un estado soluble (distribución difusa) o concentrándose en estructuras simples (las imágenes de microscopía confocal no muestran estructuras filamentosas en todos los estadios de *T. cruzi*, además, ya se había mencionado que actina se concentra en la fracción celular soluble de los epimastigotes). Esta característica en la distribución puede deberse a las propiedades intrínsecas de la proteína (no están muy conservadas las regiones asociadas a la polimerización), y al conjunto de proteínas que interactúan con actina en el parásito (por ejemplo, el genoma de *T. cruzi* carece de genes homólogos para proteínas involucradas en la formación y en el corte de haces y redes de actina, y para activadores de la nucleación).

11. PERSPECTIVAS.

Primero, es de interés tener más detalle de la distribución intracelular de actina en los diferentes estadios de *T. cruzi*. Para este fin es ideal realizar la inmunodetección de la proteína con Microscopía Electrónica de Transmisión. Durante la realización del presente proyecto se comenzó a estandarizar técnicas para éste estudio en epimastigotes (Apéndice 7).

Segundo, es importante probar experimentalmente las funciones sugeridas para actina en los estadios de *T. cruzi*. Dado que el epimastigote es una forma fácil de cultivar *in vitro* y manipular experimentalmente, se comenzó a montar modelos experimentales para estudiar el posible papel de actina en endocitosis y adherencia (Apéndice 8). El fin es probar el efecto de drogas que afectan la dinámica del citoesqueleto de actina (Citocalasina D, Jasplakinolide, Latrunculina) en estos procesos de *T. cruzi* (Apéndice 8).

Y finalmente, como un paso vital para elucidar el papel de actina en *T. cruzi*, se tiene el interés de crear mutantes nulas para actina sustituyendo los genes actina con genes de resistencia a antibióticos como los que codifican para la neomicina fosfotransferasa (*neo*) y la higromicina fosfotransferasa (*hyg*).

12. REFERENCIAS.

- Abe, A., Saeki, K., Yasunaga, T., y Wakabayashi, T. 2000. Acetylation at the N-terminus of actin strengthens weak interaction between actin and myosin. *Biochem Biophys Res Commun.* 268:14-9.
- Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4a. ed., Garland.
- Andrade, L. O., y Andrews, N. W. The *Trypanosoma cruzi* -host cell interplay: Location, invasion, retention. 2005. *Nature Reviews Microbiology* 3: 819-823.
- Andrews, N.W., Hong, K.S., Robbins, E.S., y Nussenzweig, V. 1987. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 64: 474-484.
- Atwood III, J. A., Weatherly, D.B., Minning, T.A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F.R., Orlando, R., y Tarleton, R.L. 2005. *The Trypanosoma cruzi Proteome*. *Science*. 309:473-476.
- Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., y Drubin, D.G. 1997. High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol.* 137:399-416.
- Belmont, L.D., Orlova, A., Drubin, D.G., y Egelman, E.H. 1999. A change in actin conformation associated with filament instability after Pi release. *Proc Natl Acad Sci USA* . 96:29-34.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng,

A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., May, N., Fraser, C.M., Melville, S.E., y El-Sayed, N.M. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 309:416-22.

Bogitsh, B.J., Ribero-Rodrigues, R., y Carter, C.E. 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.

Bonaldo, M.C., Souto-Padron, T., De Souza, W. Y Goldenberg, S. 1998. Cell-Substrate adhesión during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *The Journal of Cell Biology*. 106:1349-1358.

Bretschneider, T., Jonkman, J., Köhler, J., Medalia, O, Barisic, K., Weber, I., Stelzer, E.H., Baumeister, W., y Gerisch, G. 2002. Dynamic organization of the actin system in the motile cells of Dictyostelium. *J Muscle Res Cell Motil*. 23:639-49.

Brugerolle, G., Bricheux, G., y Coffe, G. 1996. Actin cytoskeleton demonstration in *Trichomonas vaginalis* and in other trichomonads. *Biol Cell*. 88:29-36.

Bubbs, M.R., Spector, I., Beyer, B.B., y Fosen, K.M. 2000. Effects of Jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. *JBC*. 5163-5170.

Camargo, E.P. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 6:93-100.

- Carlier, Y., Luguetti, A.O., Díaz, J.C.D., Tryens, C. y Kirchhoff, L. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). 2003.EMedicine. <http://www.emedicine.com/med/topic327.htm#target1>.
- Cevallos, A.M., López-Villaseñor, I., Espinosa, N., Herrera, J., y Hernández, R. 2003. *Trypanosom cruzi*: allelic comparison of the actins genes and análisis of their transcripts. *Experimental Parasitology*. 103:27-34.
- Cevallos, A.M., Pérez-Escobar, M., Espinosa, N., Herrera, J., López-Villaseñor, I., y 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*. 246:259-64.
- Cassola, A., De Gaudenzi, J.G., y Frasch, A.C. 2007. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol Microbiol*. 65:655-70.
- Chhabra, E.S., y Higgs, H.N. 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature Cell Biology*. 9:1110 –1121.
- Chimini, G. y Chavrier, P. 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat. Cell Biol*. 2: 191-196.
- Croft, S.L., Barrett, M.P., y Urbina J.A. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *TRENDS in Parasitology*. 21:508-512.
- De Arruda, M.V., y Matsudaira, P. 1994. Cloning and sequencing of the *Leishmania major* actin-encoding gene. *Gene*. 139:123-5
- De Melo, L.D.B., Eisele, N., Nepomuceno-Silva, J.L., Gazos, U. 2006. TcRho1, the *Trypanosoma cruzi* Rho homologue, regulates cell-adhesion properties: Evidence for a conserved function. *Biochem Biophys Res Commun*. 345: 617-622.
- De Souza, W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology*. 86: 197-283.

- De Souza, W., Meza, I., Martínez-Palomo, A., Sabanero, M., Souto-Padron, T., y Meirelles, M.N. *Trypanosoma cruzi*: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes. *Journal of Parasitology*, 1983; 69:138-142.
- De Souza, W. 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 8: 269-85.
- Dos Remedios ,C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., y Nosworthy, N.J.2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83:433-473.
- Drubin, D.G. 1990. Actin and actin-binding proteins in yeast. 1990. *Cell Motil Cytoskeleton*.15:7-11.
- Dunn, S.R., Phillips, W.S., Green, D.R., y Weis, V.M. 2007. Knockdown of Actin and Caspase Gene Expression by RNA Interference in the Symbiotic Anemone *Aiptasia pallida*. *Bio. Bull.* 212: 250-258.
- 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., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, 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., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., y Andersson, B. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309:409-415.

- Feng, L., Kim, E., Lee, W.L., Miller, C.J., Kuang, B., Reisler, E., y Rubenstein, P.A. 1997. Fluorescence probing of yeast actin subdomain 3/4 hydrophobic loop 262–274. Actin-actin and actin-myosin interactions in actin filaments. *J Biol Chem.* 272:16829-16837.
- Fenteany, G., y Zhu, S. 2003. Small-Molecule Inhibitors of Actin Dynamics and Cell Motility. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 3: 593-616.
- Gadasi, H. 1982. Isolated *Entamoeba histolytica* actin does not inhibit DNase-I activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 104: 158-164.
- Garcia-Salcedo JA, Perez-Morga D, Gijon P, Dilbeck V, Pays E, Nolan DP. 2004. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 23:780-9.
- Gettemans, J., De Ville, Y., Vandekerckhove, J., y Waelkens, E. 1992. *Physarum* actin is phosphorylated as the actin-fragmin complex at residues Thr203 and Thr202 by a specific 80 kDa kinase. *EMBO J.* 11:3185-91.
- Goodson, H.V. y Hawse, F.H. Molecular Evolution of actin family. 2002. *Journal of Cell Science.* 2619-2622.
- Gull, K. 1999. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol.* 53:629-55.
- Guzmán, E., Zavala, J. E., Acosta, Karla. Y., y Rosado, M. E. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Biomédica.* 10:177-184.
- Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends Parasitol.* 17: 372-376.
- Guzmán-Bracho, C., García-García, L., Floriani-Verdugo, J., Guerrero-Martínez, S., Torres-Cosme, M., Ramírez-Melgar, C., Velasco-Castrejón, O. 1998. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev Panam Salud Pública.* 4: 94-98.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science.* 279: 509-514.

- Harris, H.E., Bamburg, J.R., Bernstein, B.W., y Weeds, A.G. 1982. The depolymerization of actin by specific proteins from plasma and brain: A quantitative assay. *Analytical Biochemistry*, 119:102-114.
- Henríquez, D., Pérez, N., Pance, A. y Bradley, C. 1993. Mechanisms of protein degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Res.* 26:151-157.
- Hernandez, Y., Castillo, C., Roychowdhury, S., Hehl, A., Aley, S.B., y Das, S. 2007. Clathrin-dependent pathways and the cytoskeleton network are involved in ceramide endocytosis by a parasitic protozoan, *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol.* 37:21-32.
- Higaki, T., Sano, T., y Hasezawa, S. 2007. Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 10:549-56.
- Hirono, M., Kumagai, Y., Numata, O. y Watanabe, Y. 1989. Purification of *Tetrahymena* actin reveals some unusual properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:75–79.
- Hirono, M., Sutoh, K., Watanabe, Y. y Ohno, T. 1992. A chimaeric actin carrying N-terminal portion of *Tetrahymena* actin does not bind to DNase I. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184: 1511-1516.
- Hirono, M., Uryu, S., Ohara, A., Kato-Minoura, T., y Kamiya, R. Expression of conventional and unconventional actins in *Chlamydomonas reinhardtii* upon deflagellation and sexual adhesion. 2003. *Eukaryot Cell.* 2:486-93.
- Holetz, F.B., Correa, A., Avila, A.R., Nakamura, C.V., Krieger, M.A., y Goldenberg, S. 2007. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* 356:1062-1067.
- 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., Muller-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., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, 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., y Myler, P.J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309:436-42.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E.F. y Holmes, K.C. 1990. Atomic structure of the actin-DNase I complex. *Nature* 347: 37-44.

Kaibuchi, K., Kuroda, S., y Amano, M. 1999. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 459-486.

Kameyama, K., Kishi, Y., Yoshimura, M., Kanzawa, N., Sameshima, M., y Tsuchiya, T. 2000. Tyrosine phosphorylation in plant bending. *Nature*. 407:37.

Kanzawa, N., Hoshino, Y., Chiba, M., Hoshino, D., Kobayashi, H., Kamasawa, N., Kiski, Y., Osumi, M., Sameshima, M. y Tsuchiya, T. 2006. Change in the actin cytoskeleton during seismonastic movement of *Mimosa pudica*. *Plant Cell Physiol.* 47: 531–539.

Kim, E., Wriggers, W., Phillips, M., Kokabi, K., Rubenstein, P.A., y Reisler, E. 2000. Cross-linking constraints on F-actin structure. *J Mol Biol.* 299:421-429.

Kim, E., y Reisler, E. 1996. Intermolecular coupling between loop 38–52 and the C-terminus in actin filaments. *Biophys J.* 71:1914-1919.

Kleffmann T., Schmidt J. y Schaub G.A. 1998. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *J Eukaryot Microbiol.* 45:548-555.

- Kohl, L., Robinson, D., y Bastin, P. 2003. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J.* 22:5336-5346.
- Kollien, A.H., Schmidt, J., y Schaub, G.A. 1998. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Tropica.* 70:127-141.
- Lew, D.J. 2002. Formin' actin filament bundles. *Nature Cell Biology.* 4: 29–30.
- Liu, N., Academia, K., Rubio, T., Wehr, T., Yeck, T., Jordan, L., Hamby, K., y Paulus, A. 2007. Actin deficiency induces cofilin phosphorylation: proteome analysis of HeLa cells after beta-actin gene silencing. *Cell Motil Cytoskeleton.* 64:110-20.
- Liu, X., Shu, S., Hong, M.S., Levine, R.L., y Korn, E.D. 2006. Phosphorylation of actin Tyr-53 inhibits filament nucleation and elongation and destabilizes filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:13694-13699.
- Luo, L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 1: 173-180.
- Malickablaszkiewicz, M. y Roth, J. S. 1983. Evidence for the presence of DNase actin complex in I1210 leukemia-cells. *FEBS Letters.* 153: 235-239.
- Mauricio, S.M., Nepomuceno, J.L., Cunha, N., De Souza, W. y Gazos, U. 2000. Characterization of a Rab11 homologue in *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* 243:179-85.
- Mermall, V., Post, P.L., y Mooseker, M.S. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science.* 279: 527-533.
- Mermelstein, C.S., Rodríguez, A.P., Einicker-Lamas, M., Navarrete, R.E., Farina, y M. Costa, M.L. 1998. Distribution of F-actin, alpha-actinin, tropomyosin, tubulin and organelles in *Euglena gracilis* by immunofluorescence microscopy. *Tissue Cell.* 30:545-53.
- Meyer, H. y De Souza, W. 1973. On the fine structure of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures of pigment epithelium from the chick embryo. Uptake of melanin granules by the parasite. *J Protozool.* 20:590-593.

- Mizuno, Y., Makioka, A., Kawazu, S., Kano, S., Kawai, S., Akaki, M., Aikawa, M. y Ohtomo, H. 2002. Effect of jasplakinolide on the growth, invasion, and actin cytoskeleton of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Research*. 88:844-848.
- Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D., y Botstein, D. 1994. Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J Cell Biol*. 125:381-91.
- Mortara, R.A. 1989. Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. *J Protozool*. 36:8-13.
- Muto, E., Edamatsu, M., Hirono, M., y Kamiya, R. 1994. Immunological detection of actin in the 14S ciliary dynein of *Tetrahymena*. *FEBS Lett*. 343:173-7.
- Nakamura, A., y Kohama, K. 1999. Calcium regulation of the actin-myosin interaction of *Physarum polycephalum*. *Int Rev Cytol*. 191:53-98.
- Otterbein, I., Graceffa, P., y Dominguez, R. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science*. 293: 708–711.
- Pance, A., y Henríquez, D. 1992. Changes in proteolytic activity during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Int*. 27:613-623.
- Pereira-Neves, A., y Benchimol, M. 2007. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell*. 99:87-101.
- Piperno, G., y Luck, D.J. 1979. An actin-like protein is a component of axonemes from *Chlamydomonas flagella*. *J Biol Chem*. 254:2187-90.
- Podolski, J. L. y Steck, T. L. 1988. Association of deoxyribonuclease I with the pointed ends of actin filaments in human red blood cell membrane skeletons, *J Biol Chem*. 263: 638-645.

- Porto-Carreiro, I., Attias, M., Miranda, K., De Souza, W., y Cunha-e-Silva, N. 2000. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *European Journal of Cell Biology*. 79: 858-869.
- Poulsen, N.C., Spector, I., Spurck, T.P., Schultz, T.F., y Wetherbee, R. 1999. Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system. *Cell Motil Cytoskeleton*. 44:23-33.
- Robinson, D. R., Sherwin, T., Ploubidou, A., Byard, E.H., y Gull, K. 1995. Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J. Cell Biol.* 128:1163-1172.
- Rosestolato, C.T., Dutra Jda, M., De Souza, W., y De Carvalho, T.M. 2002. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct Funct*. 27:91-8.
- Rubenstein, P.A., y Wen, K.K. 2005. Lights, camera, actin. *IUBMB Life*. 57:683-7.
- Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill, 749–754.
- Sahasrabuddhe, A.A., Bajpai, V.K., y Gupta, C.M. 2004. A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules. *Mol Biochem Parasitol*. 134:105-114.
- Sahoo, N., Beatty, W., Heuser, J., Sept, D., y Sibley, L.D. 2006. Unusual Kinetic and Structural Properties Control Rapid Assembly and Turnover of Actin in the Parasite *Toxoplasma gondii*. *MCB*. 17:895-906.
- Schafer, D. A., Jennings, P. B., y Cooper, J.A. 1998. Rapid and efficient purification of actin from non-muscle sources. *Cell Mot.Cytoskel*. 39: 166-171.
- Schmidt, A., y Hall, M.N. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14:305-38.

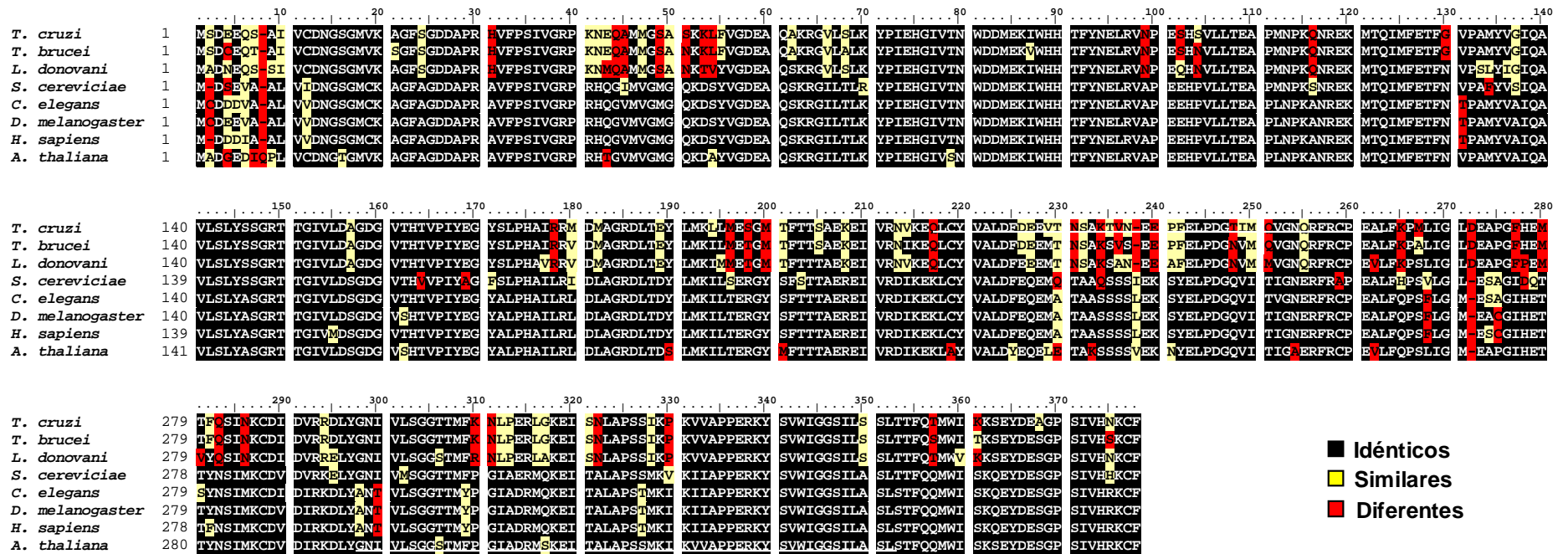
- Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C., y Ullu, E. 2000. Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA*. 6:1069-76.
- Shaw, M.K. y Tilney, L.G. Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: Visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *PNAS*. 96: 9095-9099.
- Shih, Y. y Rothfield, L. 2006. The Bacterial Cytoskeleton. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70: 729-754.
- Silva, E.O., Saraiva, E. M.B., De Souza, W. y Souto-Padrón, T. 1998. Cell surface characterization of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* obtained from different sources. *Parasitol Res*. 84:257-263.
- Small, J., Rottner, K., Hahne, P., y Anderson, K.I. 1999. Visualising The Actin Cytoskeleton. *Microscopy Research And Technique*. 47:3–17.
- Soares, M.J., y De Souza, W. 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 77:461-8.
- Soares, M.J., Souto-Padron, T., y De Souza, W. 1992. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci*. 102:157-167.
- Souto-Padrón, T., Lima, A.P., y Ribeiro Rde, O. 2006. Effects of dibucaine on the endocytic/exocytic pathways in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 99:317-20.
- Souto-Padrón, T. Harth, G. y De Souza W. 1990b. Immunocytochemical localization of neuraminidase in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 50:272-278.
- Souto-Padrón, T., Almeida, I.C., De Souza, W. y Travassos, L.R. 1994. Distribution of α -galactosyl-containing epitopes on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote and amastigotes forms from infected Vero cells detected by chagasic antibodies. *J Euk Microbiol*. 41:41-54.

- Souto-Padrón, T., Campetella, O.E., Cazzulo, J.J. y De Souza, W. 1990a. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci.* 96:485-490.
- Souza, A.L. y Araújo R.M. 2007. Effect of sphingosine and phorbol-12-myristate-13-acetate on the growth and dimethylsulfoxide-induced differentiation in the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai*. *102*: 601-604.
- Soyer-Gobillard, M.O., Ausseil, J., y Géraud, M.L. 1996. Nuclear and cytoplasmic actin in dinoflagellates. *Biol Cell.* 87:17-35.
- Sussman, D. J., Sellers, J. R., Flicker, P., Lai, E. Y., Cannon, E., Szent-Györgyi, A. G., y Fulton, C. 1984. Actin of *Naegleria gruberi*. *J.Biol.Chem.* 259:7349-7354.
- Tyler, K.M. y Engman, D.M. 2000. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 46:269-278.
- Tyler, K.M., y Engman, D.M. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 31:472-481.
- Vanhamme, L., y Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 59: 223–240.
- Vázquez, J., Franco, E., Reyes, G., y Meza, I. 1995. Characterization of adhesion plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 32:37-45.
- Velasco-Castrejon, O., Valdespino, J.L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzman-Bracho, C., Magos, C., Llausas, A., Gutierrez, G., Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Publica Mex.* 34: 186-196.
- Villalobo, E., Pérez-Romero P., Sánchez-Silva R., y Torres, A. 2001. Unusual characteristics of ciliate actins. *Int Microbiol.* 4:167-174.

- Waghabi, M.C., Keramidas, M., Bailly, S., Degrave, W., Mendonca-Lima, L., Soeiro, M. de N., Meirelles, M. de N., Paciornik, S., Araujo-Jorge, T.C., y Feige, J.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.
- Watanabe, Y., Hayashi, M., Yagi, T., y Kamiya, R. 2004. Turnover of actin in *Chlamydomonas* flagella detected by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Cell Struct Funct.* 29:67-72.
- Williams, N.E., Tsao, C.C., Bowen, J., Hehman, G.L., Williams, R.J., y Frankel, J. 2006. The Actin Gene *ACT1* Is Required for Phagocytosis, Motility, and Cell Separation of *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryotic Cell.* 5:555-567.
- World Health Organization. Chagas. (2006). <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>.
- Yanagisawa, H. A., y Kamiya, R. 2001. Association between actin and light chains in *Chlamydomonas* flagellar inner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 443-447.
- Yao, X., Grade, S., Wriggers, W., y Rubenstein, P.A. 1999. His(73), often methylated, is an important structural determinant for actin. A mutagenic analysis of HIS(73) of yeast actin. . *Biol Chem.* 274:37443-37449.
- Zackroff, R.V., y Hufnagel, L.A. 2002. Induction of anti-actin drug resistance in *Tetrahymena*. *J Eukaryot Microbiol.* 49:475-477.

13. APÉNDICES.

Apéndice 1. Figura 1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de actina de *T. cruzi* con la actina de otros organismos.



■ Idénticos
 ■ Similares
 ■ Diferentes

Apéndice 2. Obtención de un suero policlonal anti-actina de *T. cruzi* recombinante.

El gen que codifica para actina de *T. cruzi* (Cevallos *et al.*, 2003, número de acceso en el GeneBank: AF494294) se sub-clonó en el vector de expresión pGEX-3X de Pharmacia, quedando la secuencia del gen fusionada, en fase, en el extremo 5´ a la secuencia codificadora de la proteína glutatión S-transferasa o GST (27 kDa). Se transformaron con el vector bacterias *E. coli* cepa BL21 (DE3), y se indujo la expresión de la proteína recombinante con 100 mM de IPTG. El cultivo inducido se cosechó, sonicó y solubilizó con Sarkosyl. La proteína actina recombinante se purificó con cromatografía por afinidad a Sepharosa 4-B glutatióna (Pharmacia, Biotech). La proteína recombinante se eluyó de la columna con la solución de elusión de Amersham Pharmacia Biotech. Dada la presencia de proteínas contaminantes, el eluato se corrió en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%, teñido con azul de Coomassie y la banda correspondiente a la proteína de fusión fue cortada del gel y electroeluida de éste. La proteína electroeluida se dializó y concentró.

Antes de inmunizar al conejo, se obtuvo un suero pre-inmune mediante el sangrado de la vena marginal de la oreja del animal. Para inmunizar, se empleó de 200 µg de proteína purificada emulsificada con en 1ml de adyuvante de Freund completo, y se inoculó la mezcla subcutáneamente en el lomo del conejo. Cuatro y ocho semanas después, el conejo se volvió a inmunizar en dos ocasiones con 130µg de la proteína en 1ml adyuvante de Freund incompleto en intervalos de 4 o 5 semanas. Se tomaron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja para monitorear los títulos de anticuerpos mediante western blot. Con la tercera dosis se obtuvo el título de anticuerpos deseado; 15 días post-refuerzo, se sangró a blanco el conejo por punción del corazón. Los sueros pre-inmune e inmune se colectaron después de dejar coagular la sangre por 30 min y se centrifugar a 5,000 xg durante 20min.

Apéndice 3. Infección de células NIH3T3 con epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL Brener.

Las células NIH3T3 se cultivan en medio DMEM (GIBCO) pH 7.2 complementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (GIBCO) y 0.5 µl/100ml de antibióticos en cajas de cultivo de 21cm, en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. Para la infección de un cultivo

celular en una caja de 21cm con una confluencia del 70 %, se le aplica un inóculo de 2×10^7 epimastigotes en medio DMEM alta glucosa con SFB 2 % y antibióticos. El cultivo se incuba a 37 °C y 5 % de CO₂. La infección es basolateral, y el epimastigote se pega a la membrana a través de la punta del flagelo. La entrada del parásito al fibroblasto es vacuolar. Se cambia el medio cada 48 hr. Al cuarto día de infección, las células hospedero presentan cambios morfológicos: dejan de tener proyecciones, se vuelven redondas, pero siguen adheridas; además se llenan de vacuolas, especialmente en la zona por donde penetró el parásito. Al sexto día, se aprecian amastigotes en el citoplasma. Entre el octavo día y noveno día, hay liberación de amastigotes y tripomastigotes por lisis celular de las células hospedero. En la primera semana hay aproximadamente 15 % de amastigotes y 75 % de tripomastigotes en el sobrenadante. En la segunda semana aumenta la cantidad de amastigotes en el sobrenadante, en promedio, se tiene 25 % de amastigotes (pueden producirse hasta 30 -50 %). Esto se debe a que muchos de los tripomastigotes liberados previamente, se transforman en una forma de amastigote extracelular (que es más grande que el amastigote intracelular liberado por las células infectadas) por efecto del cambio de pH en el medio, ya que este se acidifica conforme transcurre la infección.

Apéndice 4. Preparación del amortiguador de carga para proteínas.

| <u>Concentración Final:</u> | <u>Stock:</u> | <u>Para 10ml:</u> | Notas: |
|-----------------------------|---------------|-------------------|--|
| Tris-HCl 62.5mM pH 6.8 | 0.5M | 1.25ml | Se almacena a TA. Antes de emplearse, se añaden 50 µl de β-mercaptoetanol a 950 µl del amortiguador. |
| Glicerol 25% | 100% | 2.5ml | |
| SDS 2% | 10 % (p/v) | 2ml | |
| Azul de bromofenol 0.01% | 0.5% (p/v) | 0.2ml | |
| H ₂ O | | 3.55ml | |

Apéndice 5. Preparación de la solución de lisis para parásitos con Tritón X-100 0.1%.

| <u>Concentración Final:</u> | <u>Stock:</u> | <u>Para 10ml:</u> | Notas: |
|-----------------------------|---------------|-------------------|--|
| Tritón X-100 1% | 100% | 100µl | Se esteriliza por filtración (poro 0.2 µm). Se prepara antes de emplearse. |
| PMSF 1mM | 100mM | 100µl | |
| Leupeptina 13µg/ml | 10mg/ml | 13µl | |
| Aprotinina 13µg/ml | 10mg/ml | 13µl | |
| H ₂ O | | 9.774ml | |

Apéndice 6. Conservación de residuos importantes para la interacción con algunas ABPs y otras moléculas en la secuencia de aminoácidos actina de *T. cruzi*.

El alineamiento de secuencias se realizó con el programa CLUSTAL W, la identidad se calculó con el programa LALIGN.

Símbolos:

Asterisco, *, los residuo en la columna son idénticos.

Dos puntos, :, la substitución es conservada

Un punto, ., la substitución es semi-conservada.

Espacio, no conservado

Se encuadran en gris los residuos que involucran los sitios de unión con las moléculas; en el caso de faloidina se encuadraron en negro.

SITIOS DE UNIÓN ACTINA-ACTINA:

De los residuos aminoácido importantes para las interacciones intermoleculares reportados por Kim *et al* (2000) –subrayados-, no está conservado S265.

Identidad: 64.5%

```

rabbit      -DEDETALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFPISIVGRPRHOGVMVGMGQKDSYVGDEAQ 59
Trypanosoma MSDEECSAIVCDNGSGMVKAGFGSDDAPRHVFPISIVGRPKNQEAMMGSAKKLKLVGDEAQ 60
           .:::* :*:*****:*****:***** *****:>:: .:* .*. :*****

rabbit      SKRGIITLKYPIEHGIITNWDMEKIIWHHTFYNELRVAPEHHPTLLTEAPLNPKANREKM 119
Trypanosoma AKRGVLSSLKYPIEHGIVTNWDMEKIIWHHTFYNELRVNPESHVLLTEAPMNPKQNREKM 120
           :***:*.*****:*****:***** ***** *.*.*****:*** *****

rabbit      TQIMFETFNVPPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAAIMRLD 179
Trypanosoma TQIMFETFGVPPAMYVGIQAVLSLYSSGRTTGIVLDAGDGVTHTVPIYEGYSLPHAIRRMD 180
           ***** .*****.*****:*****:*****.*****.*****:***** *:*

rabbit      LAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEKS 239
Trypanosoma MAGRDLTEYLMKLLMESGMTFTTSAAKEIVRNVKEQLCYVALDFDEEVTNSAKTVN-EEP 239
           :*****:*****:* * * :*.*****:*****:*****:*****:*****:***** *:.

rabbit      YELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESA-GIHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNV 298
Trypanosoma FELPDGTIMQVGNQRFRCPEALFKPMLLIGLDEAPGFHEMTFQSINKCDIDVRRDLYGNIV 299
           :***** :: :*****:*****:*****:***** *:* *:* *:* *:* *:* *:* *:*

rabbit      MSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIT 358
Trypanosoma LSGGTTMFKNLPERLGKEISNLAPSSIKPKVVAPPERKYSVWIGGSILSSLTTFQTMWIK 359
           :*****: .:.*: ***: *****:* * :*****:*****:*****:***** *:.

rabbit      KCEYDEAGPSIVHRKCF 375
Trypanosoma KSEYDEAGPSIVHNKCF 376
           *.*****.***

```

SITIOS DE UNIÓN A ADF/COFILINA (proteína presente en *T. cruzi*):

Identidad: 76.9%

```

rabbit      -DEDETTALVCDN[REDACTED]GSGLVKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQ 59
Trypanosoma MSDEEQSAIVCDN[REDACTED]GSGMVKAGFSGDDAPRHVFPSIVGRPKNEQAMMGSASKKLFVGVGDEAQ 60
          .:.* :*:*****:*****:***** *****:.. :.* ..* :*****

rabbit      SKRGILTLYKPIEHGIIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREKM 119
Trypanosoma AKRGVLSLKYPPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVNPESHVLLTEAPMNPKNREKM 120
          :***:*:*****:*****:***** ***** *.*.*****:*** *****

rabbit      TQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR[REDACTED]TTGIVLDSGDGVTHNVP[REDACTED]YEGYALPHA[REDACTED]IMRLD 179
Trypanosoma TQIMFETF[REDACTED]GVPAMYVGIQAVLSLYSSGR[REDACTED]TTGIVLDAGDGVTH[REDACTED]TVPI[REDACTED]YEGYSLPHAIRMD 180
          ***** .***** .*****:*****:***** .*****:***** *:*

rabbit      LAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEKS 239
Trypanosoma MAGRDLTEYLMKLLMESGMTFTTSAEKEIVRN[REDACTED]VKEQLCYVALDFDEEV[REDACTED]TNSAKTVN-EEP 239
          :*****:*****:* * * :*.***:*****:***:*****:***:..*.: .*.:

rabbit      YELPDGQVITIGNERFRCPETL[FQPSFIGMESA-GIHETTYNSIMKCDID][REDACTED]RDKLYANNV 298
Trypanosoma FELPDGTIMQVGNQRFRCPEALFKPMLIGLDEAPGFHEM[REDACTED]TFQSINKCDID[REDACTED]VRRDLYGNIV 299
          :***** :. :*:*****:***:* :*:*:. * ** * :** *****:***:*.* *

rabbit      MSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPP[REDACTED]ERKYSVWIGGSILASLSTFQ[REDACTED]MWIT 358
Trypanosoma LSGGTTMFKNLP[REDACTED]RGLGKEISNLAPSSIKPKV[REDACTED]VAPP[REDACTED]ERKYSVWIGGSILSSLTTFQ[REDACTED]TMWIK 359
          :*****: .:.*: ***: *****:* * :*:*****:*****:***:*** **

rabbit      [REDACTED]KQEYDEAGPSIVH[REDACTED]RCKF 375
Trypanosoma [REDACTED]KSEYDEAGPSIVH[REDACTED]NKCF 376
          * .***** .***
  
```

SITIOS DE UNIÓN A PROFILINA (proteína presente en *T. cruzi*):

Identidad: 90.5%

```

rabbit      -DEDETTALVCDN[REDACTED]GSGLVKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQ 59
Trypanosoma MSDEEQSAIVCDN[REDACTED]GSGMVKAGFSGDDAPRHVFPSIVGRPKNEQAMMGSASKKLFVGVGDEAQ 60
          .:.* :*:*****:*****:***** *****:.. :.* ..* :*****

rabbit      SKRGILTLYKPIEHGIIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREKM 119
Trypanosoma AKRGVLSLKYPPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVNPESHVLLTEAPMNPKNREKM 120
          :***:*:*****:*****:***** ***** *.*.*****:*** *****

rabbit      TQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR[REDACTED]TTGIVLDSGDGVTHNVP[REDACTED]YEGYALPHA[REDACTED]IMRLD 179
Trypanosoma TQIMFETF[REDACTED]GVPAMYVGIQAVLSLYSSGR[REDACTED]TTGIVLDAGDGVTH[REDACTED]TVPI[REDACTED]YEGYSLPHAIRMD 180
          ***** .***** .*****:*****:***** .*****:***** *:*

rabbit      LAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEKS 239
Trypanosoma MAGRDLTEYLMKLLMESGMTFTTSAEKEIVRN[REDACTED]VKEQLCYVALDFDEEV[REDACTED]TNSAKTVN-EEP 239
          :*****:*****:* * * :*.***:*****:***:*****:***:..*.: .*.:

rabbit      YELPDGQVITIGNERFRCPETL[FQPSFIGMESA-GIHETTYNSIMKCDID][REDACTED]RDKLYANNV 298
Trypanosoma FELPDGTIMQVGNQRFRCPEALFKPMLIGLDEAPGFHEM[REDACTED]TFQSINKCDID[REDACTED]VRRDLYGNIV 299
          :***** :. :*:*****:***:* :*:*:. * ** * :** *****:***:*.* *

rabbit      MSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPP[REDACTED]ERKYSVWIGGSILASLSTFQ[REDACTED]MWIT 358
Trypanosoma LSGGTTMFKNLP[REDACTED]RGLGKEISNLAPSSIKPKV[REDACTED]VAPP[REDACTED]ERKYSVWIGGSILSSLTTFQ[REDACTED]TMWIK 359
          :*****: .:.*: ***: *****:* * :*:*****:*****:***:*** **
  
```


| | | |
|-------------|---|-----|
| rabbit | TQIMFETFNPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVLDSGDGVTHNVP IYEGYALPHAIMRLD | 179 |
| Trypanosoma | TQIMFETFVGPAMYVGIQAVLSLYSSGRRTGIVLDAGDGVTHTVPIYEGYSLPHAIRMD | 180 |
| | ***** . ***** . *****:*****:***** . *****:***** * : * | |
| rabbit | LAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEKS | 239 |
| Trypanosoma | MAGRDLTEYLMKLLMESGMTFTTSAEKEIVRNVKEQLCYVALDFDEEVTNSAKTVN-EEP | 239 |
| | :*****:*****: * * * : * . :*****:*****:*****:*****:***** . * : . | |
| rabbit | YELPDGQVITIGNERFRCPELTFQPSFIGMESA-GIHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNV | 298 |
| Trypanosoma | FELPDGTIMQVGNQRFRCPEALFKPMLIGLDEAPGFHEMTFQSINKCDIDVRRDLYGNIV | 299 |
| | :***** : : :*****:*****:***** :***** . * ***** :***** * * | |
| rabbit | MSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIT | 358 |
| Trypanosoma | LSGGTTMFKNLPERLGKEISNLAPSSIKPKVVAPPERKYSVWIGGSILSSLTTFQTMWIK | 359 |
| | :*****: . : . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | |
| rabbit | KQEYDEAGPSIVHRKCF | 375 |
| Trypanosoma | KSEYDEAGPSIVHNKCF | 376 |
| | * . ***** . *** | |

SITIOS DE UNIÓN A LATRUNCULINA (GRIS):

Identidad: 75%

SITIOS DE UNIÓN A FALOIDINA (NEGRO):

Los residuos reconocidos por la droga se conservan en la secuencia de actina de *T. cruzi*, pero faloidina no tiñe filamentos en éste organismo, posiblemente porque no se forman éstas estructuras.

Identidad: 100%

| | | |
|-------------|---|-----|
| rabbit | -DEDETTALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFP SIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQ | 59 |
| Trypanosoma | MSDEEQSAIVCDNGSGMVKAGFSGDDAPRHVFP SIVGRPKNEQAMMGSASKKLFVGDQEAQ | 60 |
| | . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | |
| rabbit | SKRGILTLYPIEHGIIITNWDMEKIWHHTFYNELRVAP EEHPTLLTEAPLNPKANREKM | 119 |
| Trypanosoma | AKRGVLSLYPIEHGIVITNWDMEKIWHHTFYNELRVN PESHVLLTEAPMNPKNREKM | 120 |
| | : * | |
| rabbit | TQIMFETFNPAMYVAIQAVLSLYASGRRTGIVLDSGDGVTHNVP IYEGYALPHAIMRLD | 179 |
| Trypanosoma | TQIMFETFVGPAMYVGIQAVLSLYSSGRRTGIVLDAGDGVTHTVPIYEGYSLPHAIRMD | 180 |
| | ***** . ***** . *****:*****:***** . *****:***** * : * | |
| rabbit | LAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSSLEKS | 239 |
| Trypanosoma | MAGRDLTEYLMKLLMESGMTFTTSAEKEIVRNVKEQLCYVALDFDEEVTNSAKTVN-EEP | 239 |
| | :*****:*****: * * * : * . :*****:*****:*****:*****:***** . * : . | |
| rabbit | YELPDGQVITIGNERFRCPELTFQPSFIGMESA-GIHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNV | 298 |
| Trypanosoma | FELPDGTIMQVGNQRFRCPEALFKPMLIGLDEAPGFHEMTFQSINKCDIDVRRDLYGNIV | 299 |
| | :***** : : :*****:*****:***** :***** . * ***** :***** * * | |
| rabbit | MSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIT | 358 |
| Trypanosoma | LSGGTTMFKNLPERLGKEISNLAPSSIKPKVVAPPERKYSVWIGGSILSSLTTFQTMWIK | 359 |
| | :*****: . : . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | |
| rabbit | KQEYDEAGPSIVHRKCF | 375 |
| Trypanosoma | KSEYDEAGPSIVHNKCF | 376 |
| | * . ***** . *** | |

APÉNDICE 8.

1. Inmunolocalización de actina con Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Para familiarizarse con la ultraestructura de los epimastigotes, inicialmente se prepararon muestras con fijación rutinaria e inclusión en EPON (Figura 2).

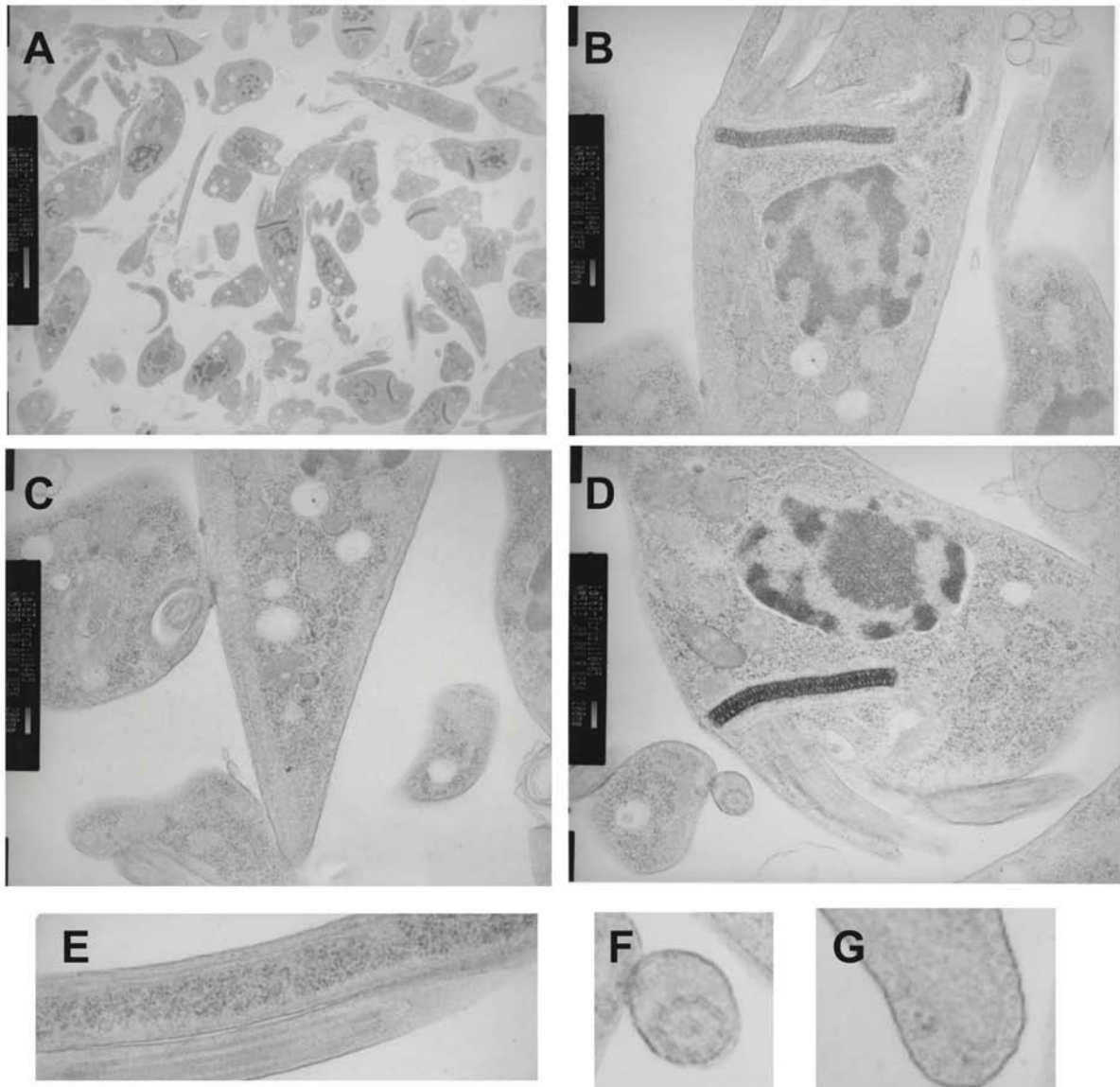


Figura 2. Micrografías d MET (aumento: A, 4kX; B a G, 25kX). Epimastigotes. Fijación con Karnovsky, post-fijación con tetraóxido de osmio, inclusión con EPON, y contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. A. Panorámica de un corte. B. Núcleo, cinetoplasto y bolsillo flagelar. C. Diversas vesículas en el extremo anterior respecto a la punta de la célula. D. Núcleo, cinetoplasto y bolsillo flagelar. E y F. Microtúbulos del flagelo. G. Microtúbulos subpeliculares.

En un primer intento de inmunolocalización, se hizo una técnica post-inclusión en la cual se utilizaron cortes de muestras de parásitos fijados que posteriormente fueron incubados con los anticuerpos para inmunolocalizar actina (Cuadro A). En este ensayo no se pudo apreciar una localización específica de las partículas de oro acopladas al segundo anticuerpo (Figura 3). Alternativamente se realizó una técnica *in toto* o pre-inclusión en donde la reacción de inmunolocalización de actina se realizó antes de la inclusión de las muestras para MET (Cuadro A). En la mayoría de las muestras analizadas no observamos partículas de oro en el interior de los epimastigotes, indicando que los anticuerpos no están penetrando la célula. Sin embargo, en las muestras de células incubadas con el suero inmune -y únicamente en estas muestras, por lo que podemos considerarla como una localización específica- se observaron varias partículas de oro adheridas a ciertas regiones de la superficie celular (Figura 3). En ambos casos, se requerirán experimentos adicionales en los que se deben variar las condiciones de incubación y de dilución del suero inmune y el segundo anticuerpo.

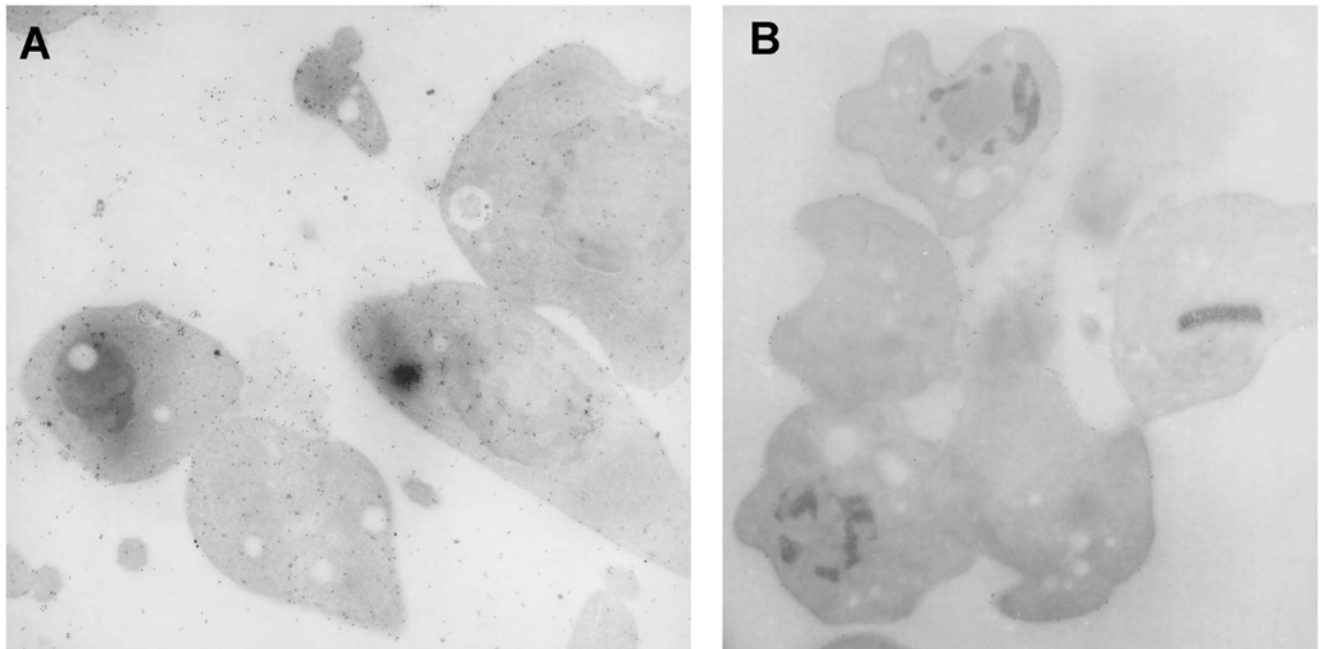


Figura 3. Micrografías de MET (aumento: A, 12kX, B, 20kX) de ensayos de inmunolocalización de actina (el anticuerpo secundario está marcado con partículas de oro de 10 nm) post-inclusión (A) y pre-inclusión (B). Fijación con Karnovsky, post-fijación con tetraóxido de osmio, e inclusión con LR-White.

Cuadro A.

Técnica post-inclusión y pre-inclusión para MET

Técnica Post-inclusión:

10 X10⁶ epimastigotes en fase ML se centrifugaron a 500 xg durante 6 min. Se lavaron dos veces con PBS pH 7.4. Se resuspendieron en medio LIT sin suero. Se incubó durante 30 min a 28 °C. Las muestras se procesaron para MET: los epimastigotes se lavaron 2 veces con PBS pH 7.4 frío, y se centrifugaron a 500 xg durante 6 min; se adicionó al pellet 1ml de fijador Karnovsky (glutaraldehído 2.5 % y paraformaldehído 1% en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M) y se dejó incubando durante 2 hr a 4 °C; posteriormente se lavó dos veces con el buffer de cacodilato frío (sin centrifugar), y finalmente se le aplicó al pellet el buffer de cacodilato frío. El pellet se deshidrató con etanol al 70 % (30 min, 2 veces), y luego con etanol al 100 % (30 min, 2 veces) a TA. Se impregnó con LR-White durante 1 hr 2 veces a TA. Se aplicó 1ml de LR-White y se dejó incubando ON a TA. Se cambió la resina por nueva, y se polimerizó durante 24 hr a 60°C (estufa). Se prepararon cortes ultrafinos de la muestra polimerizada y se colocaron sobre rejillas de oro. Los cortes ultrafinos (60 nm) se trataron con glicina al 0.5 % durante 15 min a 4 °C para inactivar los aldehídos. Posteriormente se incubó con una solución bloqueadora comercial que contiene suero de cabra (AURION), se lavó cinco veces con una solución de incubación BSA 0.1 % en PBS pH 7.4, y se incubó ON a 4 °C en diluciones 1:250 de los sueros pre-inmune o inmune en BSA 0.1 % en PBS pH 7.4. Después de realizar cinco lavados con la solución de incubación, los cortes se incubaron con una dilución 1:30 del segundo anticuerpo de cabra anti IgG de conejo marcado con partículas de oro de 10nm durante 2 hr a TA. Se realizaron cinco lavados con la solución de incubación. Las muestras se secaron a TA, y finalmente se observaron en un MET JEOL a 60 V.

Técnica Pre-inclusión:

30 X10⁶ epimastigotes en fase ML se centrifugaron a 500 xg durante 6 min. Se lavaron 2 veces con PBS pH 7.4 frío, y se centrifugaron a 500 xg durante 6 min; se adicionó al pellet 1ml del fijador preparado con paraformaldehído 4 % y glutaraldehído 1 % en PBS pH 7.4, y se dejó incubando 1 hr a TA. Se lavó tres veces con PBS. El pellet se trató con Tritón X-100 al 0.1 % en PBS durante 30 min a TA para permeabilizar, y luego se incubó en BSA 2 % en PBS durante 2 hr a TA para bloquear. Se dejó incubando ON a 4 °C en el suero inmune (dilución 1:250 en BSA 1 % en PBS). Después de tres lavados con PBS, se incubó con el segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo marcado con partículas de oro de 10 nm (AURION) (dilución 1:30 en BSA 1 % en PBS) durante 1 hr a TA. Después de lavar tres veces con PBS, la pastilla de parásitos se deshidrató con etanol al 70 % (30 min, 2 veces), y luego con etanol al 100 % (30 min, 2 veces) a TA. Se impregnó con LR-White durante 1 hr 2 veces a TA. Se aplicó LR-White y se dejó incubando ON a TA. Se cambió la resina por nueva, y se polimerizó durante 24 hr a 60 °C (estufa). Se prepararon cortes ultrafinos de la muestra polimerizada y se colocaron sobre rejillas de cobre. Las muestras se secaron a TA, y finalmente se observaron en un MET JEOL a 60 V.

2. Papel de actina en endocitosis, transporte vesicular y adhesión celular.

Durante la realización de este trabajo, se montaron modelos experimentales para estudiar posibles funciones de actina en los procesos de endocitosis y adherencia a substrato *in vitro* en epimastigotes de *T. cruzi*.

A. Técnica para MET para el seguimiento de la endocitosis de albúmina marcada con oro.

Los mecanismos de endocitosis y transporte vesicular de *T. cruzi* se han estudiado principalmente en el estadio epimastigote. En estos estudios se han seguido diversas proteínas (transferrina, BSA, LDL y HRP) marcadas con partículas de oro a través de los diversos compartimentos del parásito con la técnica de MET. La vía del transporte vesicular abarca: 1) las estructuras con función de endocitosis, el bolsillo flagelar y el citostoma, localizados en la región posterior al cinetoplasto; 2) la red endosomal temprana, compuesta por túbulos y vesículas que se extienden de la región entre el cinetoplasto y el núcleo hasta el extremo anterior de la célula; y 3) los reservosomas, localizados en la región anterior del núcleo (Soares y Souza 1991; Soares *et al.*, 1992; Porto-Carreiro *et al.*, 2000; de Figueiredo y Soares 2000; Souto-Padrón *et al.*, 2006). Se siguieron algunos de estos protocolos para observar la endocitosis y el transporte vesicular de BSA marcada con oro 25 nm. Inicialmente se siguió el protocolo de Porto-Carreiro *et al* (2000) – Cuadro B -, el cual sugiere una incubación de los parásitos con la BSA - oro en medio LIT sin suero a 28 °C durante máximo 30 min (a este tiempo, la mayor parte de las partículas deben encontrarse en los reservosomas), y el posterior procesamiento de rutina para ultraestructura en MET. En nuestros resultados, a los 30 min de incubación con la BSA - oro, se pudo apreciar que la mayor parte del oro se encontraba adherido a la membrana que recubre el bolsillo flagelar, o en el citostoma (Figura 4). Muy pocas fueron las vesículas que se apreciaron conteniendo partículas de oro. Se aumentó la cantidad de BSA - oro o se incubó durante 2 hr, y no se vieron cambios con los resultados a los 30 min (Figura 4). Estos datos contrastan con lo reportado en otros estudios e indican que el complejo BSA - oro (25 nm) no está siendo internalizado eficientemente. Posteriormente, se decidió seguir un protocolo presentado por de Souto-Padrón *et al* (2006) – Cuadro B -, que sugiere que los parásitos sean incubados con BSA - oro en medio mínimo (MEM) durante 4 hr, y luego se regresen al

medio LIT completo durante 4 hr, 6 hr y 24 hr (Figura 5). Solo siguiendo esta técnica pudimos apreciar una cantidad considerable de partículas de oro en el interior de vesículas. Como siguiente propósito se espera co-localizar a actina, e inhibir el proceso de endocitosis y/o transporte vesicular utilizando estabilizadores o desestabilizadores del citoesqueleto de actina.

Cuadro B.
Técnicas para la endocitosis de BSA y su observación con MET.

Siguiendo el protocolo de Porto-Carreiro *et al* (2000):

10 X10⁶ epimastigotes en fase ML se centrifugaron a 500 xg durante 6 min. Se lavaron dos veces con PBS pH 7.4. Se resuspendieron en 200 µl medio LIT sin suero junto con 120 µl BSA-oro (25 nm). Se incubó durante 30 min a 28 °C. Las muestras se procesaron para MET: los epimastigotes se lavaron 2 veces con PBS pH 7.4 frío, y se centrifugaron a 500 xg durante 6 min en una microcentrífuga eppendorf; se adicionó al pellet el fijador Karnovsky (glutaraldehído 2.5 % y paraformaldehído 1 % en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M) y se dejó incubando durante 2 hr a 4 °C; posteriormente se lavó dos veces con el buffer de cacodilato frío (sin centrifugar), y finalmente se le aplicó al pellet el buffer de cacodilato frío. El pellet se deshidrató con etanol al 70 % (30 min, 2 veces), y luego con etanol al 100 % (30 min, 2 veces) a TA. Se impregnó con LR-White durante 1hr 2 veces a TA. Se aplicó LR-White y se dejó incubando ON. a TA. Se cambió la resina por nueva, y se polimerizó durante 24 hr a 60 °C (estufa). Se prepararon cortes ultrafinos de la muestra polimerizada y se colocaron sobre rejillas de oro. Los cortes ultrafinos (60 nm) se trataron con glicina al 0.5 % durante 15 min a 4 °C para inactivar los aldehídos. Posteriormente se incubó con una solución bloqueadora comercial que contiene suero de cabra (AURION), se lavó cinco veces con una solución de incubación BSA 0.1 % en PBS pH 7.4, y se incubó ON a 4 °C en diluciones 1:250 de los sueros pre-inmune o inmune en BSA 0.1 % en PBS pH 7.4. Después de realizar cinco lavados con la solución de incubación, los cortes se incubaron con una dilución 1:30 del segundo anticuerpo de cabra anti IgG de conejo marcado con partículas de oro de 10 nm durante 2 hr a TA. Se realizaron cinco lavados con la solución de incubación. Las muestras se secaron a TA, y finalmente se observaron en un MET JEOL a 60 V.

Siguiendo el protocolo de Souto-Padrón *et al* (2006):

30 X10⁶ epimastigotes en fase ML se centrifugaron a 500 xg durante 6 min. Se lavaron 2 veces con PBS pH 7.4 frío, y se centrifugaron a 500 xg durante 6 min; se adicionó al pellet un fijador con paraformaldehído 4 % y glutaraldehído 1 % en PBS) y se dejó incubando 1hr a TA. Se lavó tres veces con PBS. El pellet se trató con Tritón X-100 al 0.1 % en PBS durante 30 min a TA para permeabilizar, y luego se incubó en BSA 2 % en PBS durante 2 hr a TA para bloquear. Se dejó incubando ON a 4 °C en el suero inmune (dilución 1:250 en BSA 1 % en PBS). Después de tres lavados con PBS, se incubó con el segundo anticuerpo de cabra anti IgG de conejo marcado con partículas de oro de 10 nm (dilución 1:30 en BSA 1 % en PBS) durante 1 hr a TA. Después de lavar tres veces con PBS, la pastilla de parásitos se deshidrató con etanol al 70 % (30 min, 2 veces), y luego con etanol al 100 % (30 min, 2 veces) a TA. Se impregnó con LR-White durante 1 hr 2 veces a TA. Se aplicó LR-White y se dejó incubando ON. a TA. Se cambió la resina por nueva, y se polimerizó durante 24 hr a 60 °C (estufa). Se prepararon cortes ultrafinos de la muestra polimerizada y se colocaron sobre rejillas de cobre. Las muestras se secaron a TA, y finalmente se observaron en un MET JEOL a 60 V.

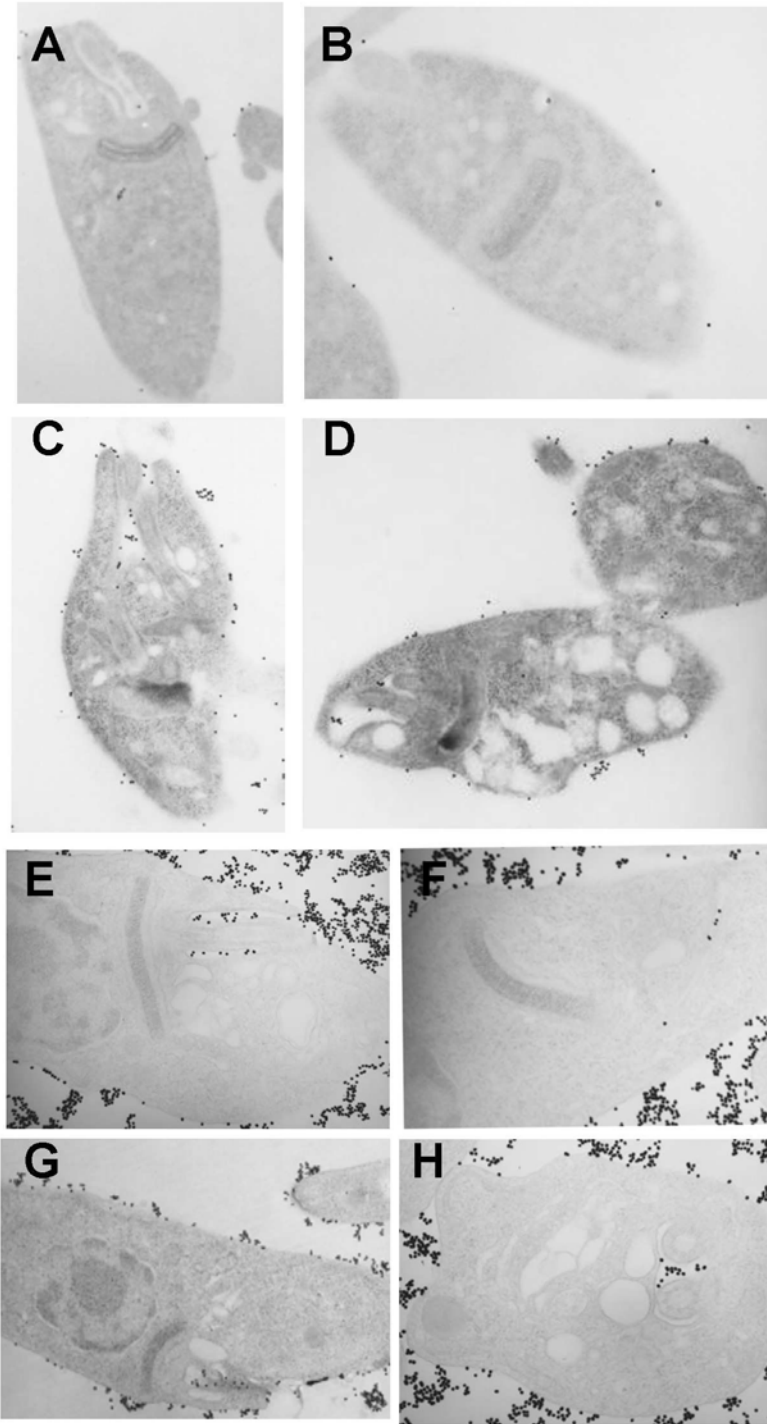


Figura 4. Micrografías de MET (aumento: 5kX; B, 15kX; C y D, 8kX; E, F y H, 20kX; y G, 8kX). Epimastigotes incubados con BSA-oro durante 2 hr (A y B) y 30 min (C y D). Epimastigotes incubados con BSA-oro (tres veces el volumen empleado en A a D) durante 2hr. Nótese la presencia de oro en el bolsillo flagelar (A, C, D, E, G y H), en el citostoma (B y F), y en algunas vesículas (A, B y D). Fijación con Karnovsky, post-fijación con tetraóxido de osmio, e inclusión con LR-White. A, B, E a H, son parásitos sin contrastar; en estas condiciones todavía pueden apreciarse muchas de las estructuras del parásito. C y D, contraste con acetato de uranilo.

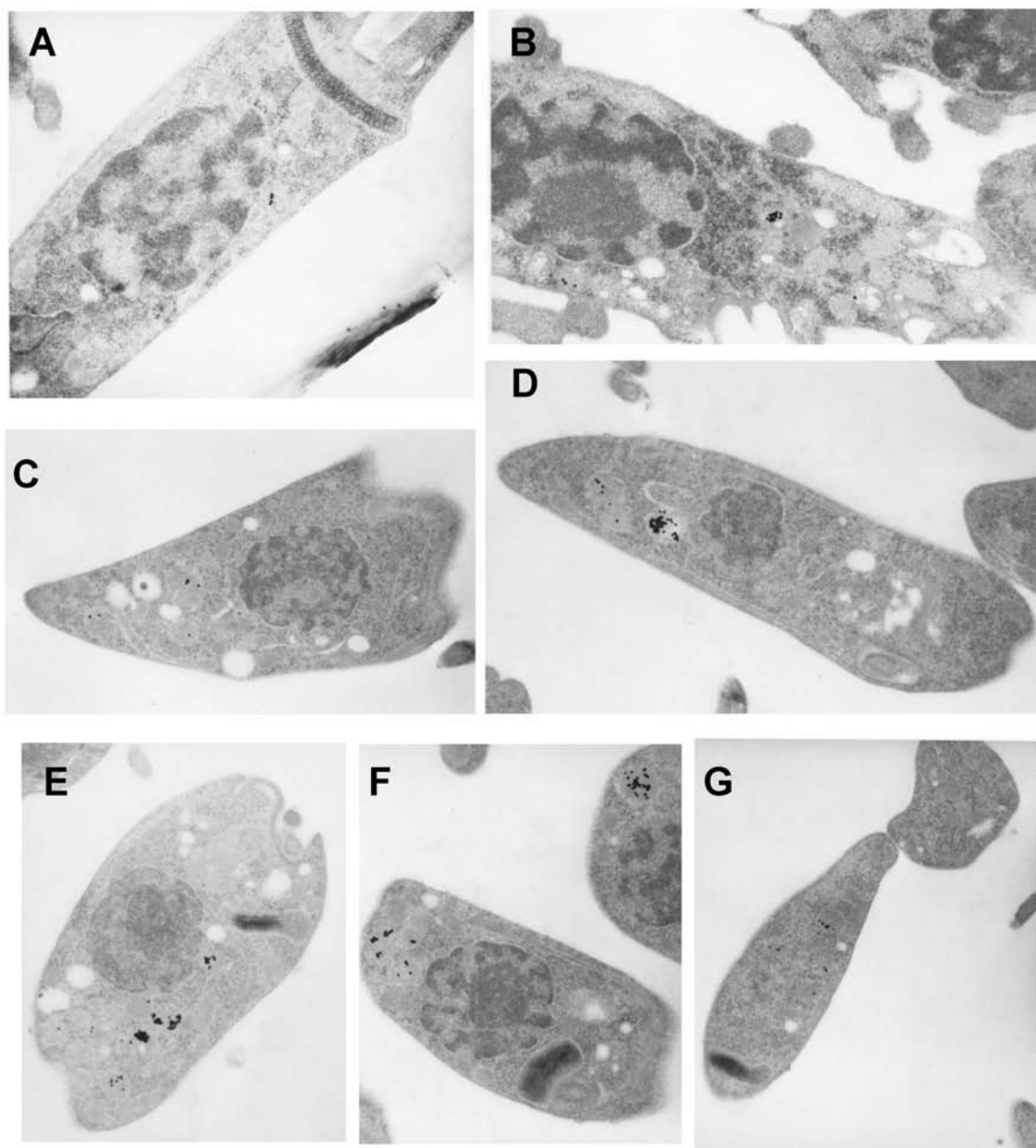


Figura 5. Micrografías de MET (aumento: A, 30kX; B, 25kX; E, 20kX; C, D y G, 15kX; y F, 12kX) de epimastigotes incubados con BSA-oro en MEM durante 4 hr y posteriormente incubados en medio LIT durante 4 hr (A), 6 hr (B) y 24 hr (C-G). Nótese la presencia de oro en vesículas localizadas en diferentes regiones del cuerpo celular, generalmente localizadas en la región anterior de la célula. Fijación con Karnovsky, post-fijación con tetraóxido de osmio, e inclusión con LR-White.

B. Ensayos de adherencia de epimastigotes *in vitro*.

- **Inmunolocalización de actina en epimastigotes adheridos *in vitro*.**

En nuestro laboratorio se ha observado que la incubación de epimastigotes en medio LIT sin suero a 28 °C induce su adhesión a través del flagelo a la superficie de cajas de cultivo o de placas de vidrio silanizadas. Esto parece deberse a que se ha quitado del medio de cultivo un componente abundante en el suero, la BSA, que se sabe previene efectivamente la adhesión de *T. cruzi* a diversas superficies hidrofóbicas (Kleffmann *et al.*, 1998). Con el fin de relacionar la adhesión con actina, se utilizaron epimastigotes que se dejaron adherir en placas de vidrio silanizadas durante 1 hr por efecto del LIT sin suero para inmunolocalizar actina mediante Microscopía Confocal (Cuadro C y Figura 6). Actina se distribuye difusamente a través del cuerpo celular y el flagelo, y presenta una concentración por detrás del cinetoplasto es evidente (tal y como sucede con los epimastigotes normales, no adheridos); en el flagelo se aprecia una señal un poco más intensa en la punta, quizás en el sitio de adhesión. Lamentablemente, estos epimastigotes presentaron fragmentación de ADN y una sensibilidad de la membrana celular, quizás por una sensibilidad al tratamiento para la inmunofluorescencia. Se intentará mejorar la técnica para evitar estos problemas.

Cuadro C.

Ensayos de adherencia 1.

1×10^8 epimastigotes en fase ML se resuspendieron en 10 ml medio LIT sin suero, y se dejaron adherir sobre placas de vidrio silanizadas colocadas en el interior de una caja Petri de 10 cm durante 2 hr a 28 °C. Para retirar las células no adheridas, se lavó la caja con PBS pH 7.4 dos veces. Las células adheridas se fijaron empleando paraformaldehído 4 % en PBS pH 7.4 durante 30 min a TA en una cámara húmeda. Las muestras se permeabilizaron con Tritón X-100 (SIGMA) al 0.1 % en PBS pH 7.4 durante 30 min a TA. Luego de bloquearse con BSA 2 % en PBS pH 7.4 durante 2 hr a TA, se aplicó el suero inmune contra actina a una dilución 1:250 en BSA 1 % en PBS pH 7.4 y se incubó durante 18 hr a 4 °C. Se realizaron 3 lavados de 15 min con BSA 1%, con agitación y a TA. Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario de cabra anti IgG de conejo conjugado con FITC (Santa Cruz Biotech) a una dilución 1:200 en BSA 1 %, incubándose durante 30 min a TA en oscuridad. Se volvió a lavar con BSA 1 % como se mencionó anteriormente. Finalmente se montó para la microscopía confocal con medio para montar Vectashield conteniendo yoduro de propidio (Vector Laboratories), el cual tiñe el ADN, permitiendo localizar el núcleo y el cinetoplasto del parásito. Las muestras se analizaron en un microscopio confocal LSM 5 Pascal de ZEISS.

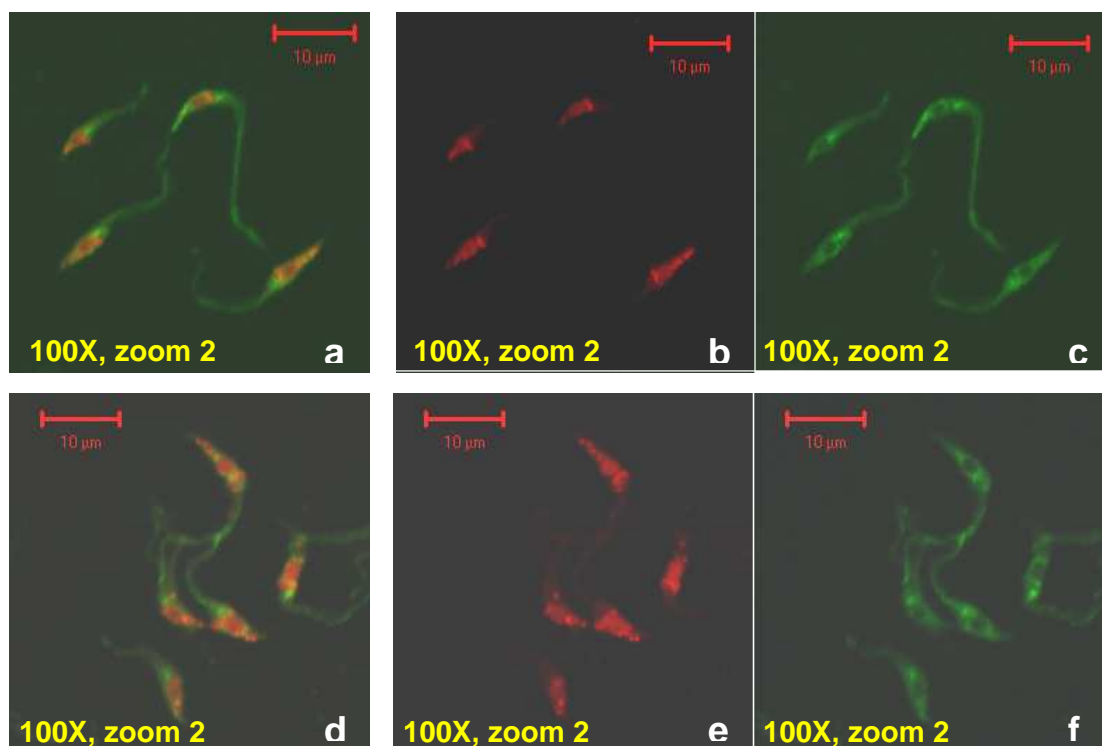


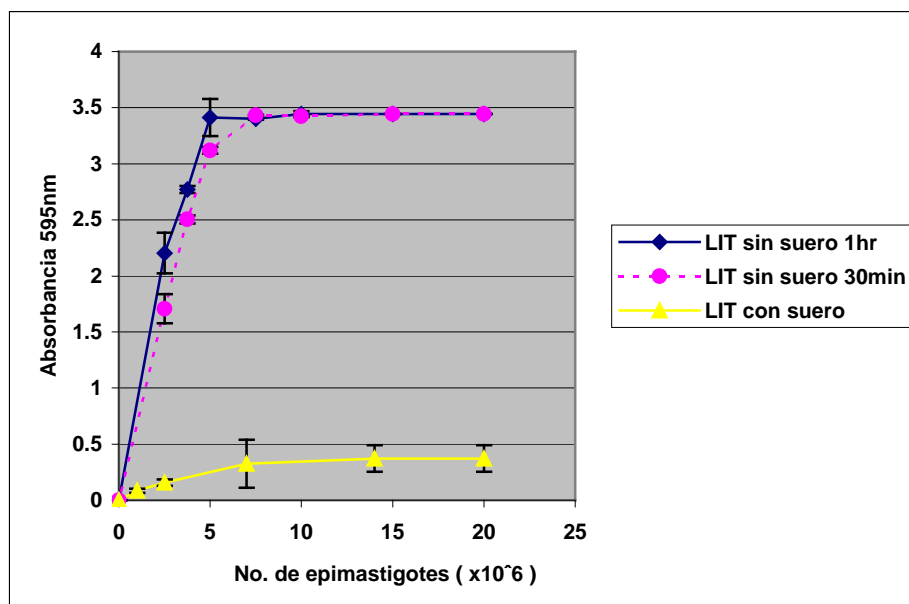
Figura 6. Epimastigotes de *T. cruzi* de fase media logarítmica (ML) adheridos y teñidos con el suero anti actina recombinante de *T. cruzi*. Señal verde: Actina. Señal roja: yoduro de propidio que tiñe ADN, observamos que el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos está fragmentado. Las imágenes a,y d, son micrografías con los canales para la señal verde y roja; b y e, para la roja; y c y f, para la verde.

- **Ensayos de adherencia de epimastigotes *in vitro*.**

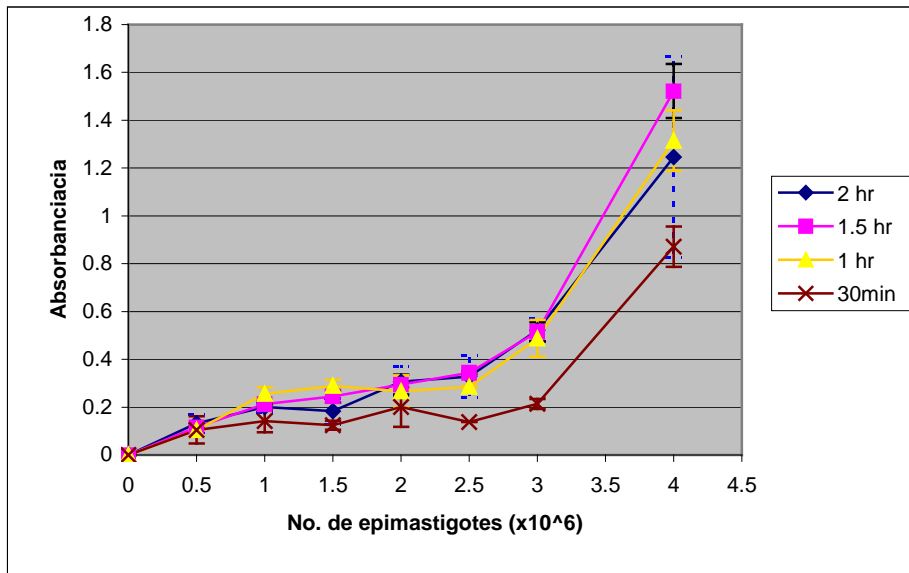
Utilizando el efecto del LIT sin suero en epimastigotes, se montó una técnica para cuantificar parásitos adheridos *in vitro*. Para éste fin, se siguió parcialmente la técnica reportada por De Melo *et al* (2006), la cual se basa en permitir la adhesión de los parásitos en cajas de 96 pozos, fijar, teñir con cristal violeta 0.1 %, solubilizar con ácido acético 1 % y leer la absorbancia a 595 nm en un ELISA –para más detalles consultar el Cuadro D-. Para estos ensayos se tuvo que estandarizar la cantidad de parásitos que se adicionarían a cada pozo y el tiempo requerido para la adhesión. Inicialmente se preparó una curva con cantidades ascendentes de parásitos, adicionados a cada pozo que se dejaron adherir con LIT sin suero a 30 min y 1 hr, contra la absorbancia medida a 595 nm (Gráfica 1). En estos resultados se observó que la absorbancia aumenta proporcionalmente a la cantidad de parásitos aplicados a cada pozo hasta que se “satura” el sistema, o sea, deja de haber diferencias en la absorbancia. La saturación inicia con

7.5 x10⁶ epimastigotes en los dos tiempos analizados. Por otro lado, se puede apreciar que 2.5 x10⁶ parásitos (aproximadamente el valor medio de la curva) podría ser la cantidad ideal para adicionarse a cada pozo en los experimentos. También se probó la influencia del tiempo de adherencia con LIT sin suero (30 min, 1 hr, 1.5 hr, y 2 hr) en la absorbancia (Gráfica 2). Con estos datos se pudo determinar que a partir de 1hr de incubación en LIT sin suero no hay diferencias en la absorbancia, indicando que después de ese tiempo no aumenta el número de parásitos adheridos. Para los experimentos se decidió trabajar con 1.5hr de incubación en LIT sin suero para la adhesión.

| Cuadro D. | |
|---|--|
| Ensayos de adherencia 2. | |
| <p>Diferentes cantidades de epimastigotes en fase ML fueron sembrados en cajas de 96 pozos. Se resuspendieron en medio LIT sin suero (en el experimento del efecto de la CD, con diferentes concentraciones de DMSO o CD) y se incubaron durante diferentes tiempos a 28 °C para permitir la adhesión. Para retirar todas las células no adheridas, se lavaron los pozos con PBS pH 7.4 dos veces. Las células adheridas se fijaron empleando glutaraldehído 2.5 % en PBS pH 7.4 durante 30 min a TA. Se lavaron nuevamente con PBS pH 7.4, y se tiñeron con azul violeta 0.1 % en PBS pH 7.4. Se solubilizó con ácido acético 10 %, y se midió la absorbancia en cada pozo a 595 nm con un lector ELISA.</p> | |

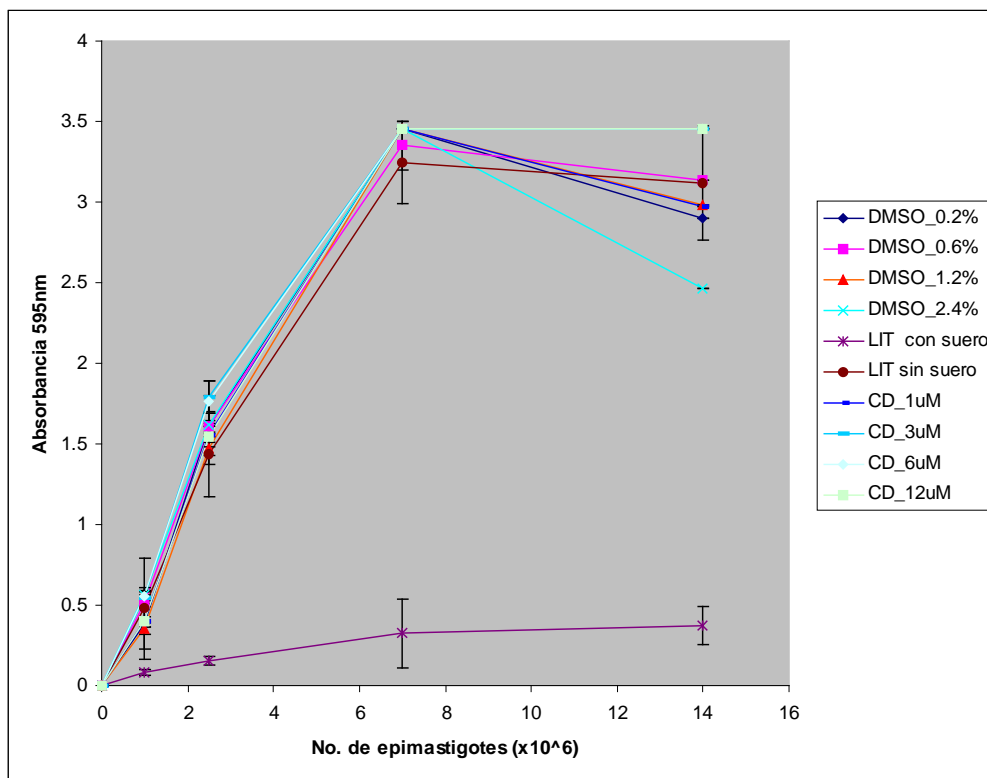


Gráfica 1. Efecto de la cantidad de epimastigotes en la adhesión. Número de epimastigotes adicionados inicialmente a cada pozo contra la absorbancia medida a 595 nm. Se presentan los resultados de la absorbancia de diferentes cantidades de parásitos incubados con LIT con suero y LIT sin suero durante los tiempos: 30 min o 1 hr. Se presentan los promedios y las barras de error, correspondientes a las desviaciones estándar, de los resultados de absorbancia de cuatro diferentes pozos.



Gráfica 2. Efecto del tiempo de incubación en la adhesión. Número de epimastigotes adicionados inicialmente a cada pozo contra la absorbiencia medida a 595 nm. Se presentan los resultados de la absorbiencia de diferentes cantidades de parásitos incubados con LIT sin suero durante diferentes tiempos (30 min, 1 hr, 1.5 hr, y 2 hr). Se presentan los promedios y las barras de error, correspondientes a las desviaciones estándar, de los resultados de absorbiencia de cuatro diferentes pozos.

Una vez montada ésta técnica, se decidió probar el efecto del tratamiento con la droga desestabilizadora de microfilamentos Citocalasina D (CD), disuelta en DMSO, en la adhesión de epimastigotes. Para este fin, se preparó una curva con cantidades ascendentes de parásitos adicionados a cada pozo (1×10^6 , 2.5×10^6 , 7×10^6 y 14×10^6 epimastigotes) que se incubaron en LIT con suero (control negativo de adhesión), en LIT sin suero, en LIT sin suero con CD ($1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $6 \mu\text{M}$ y $12 \mu\text{M}$) o en LIT sin suero con DMSO (0.05 %, 0.15 %, 0.6 %, 1.2 %, controles) durante 1.5 hr a 28°C . Pasado este tiempo, se procesó para la lectura de absorbiencia (Cuadro C). Los resultados de este experimento se presentan en la gráfica 3.



Gráfica 3. Efecto del tratamiento con CD y DMSO en la adhesión de epimastigotes incubados en LIT sin suero.

En la gráfica 3, se puede observar que no hay diferencias importantes en la absorbancia (adhesión) de los epimastigotes incubados en LIT sin suero o con las diferentes concentraciones de CD o DMSO probadas durante 1.5 hr. Es probable que se requieran mayores concentraciones CD o tiempos de incubación más largos con la droga para ver un efecto en los parásitos, aunque existe la posibilidad de que la CD pudiera no tener un efecto sobre el citoesqueleto de actina de *T. cruzi* como se reportó para *Leishmania* (un efecto quizás dependiente de características peculiares en el citoesqueleto de actina de estos protozoarios filogenéticamente relacionados). La perspectiva inmediata es probar mayor concentración de la droga (de 12 a 30 μM) en estos ensayos. También se tiene planeado determinar el efecto de otras drogas desestabilizadoras del citoesqueleto de actina.

3. Tratamiento con Jasplakinolide.

Jasplakinolide (JAS) es un péptido cíclico aislado de la esponja marina *Jaspis jhonstoni*. Es una droga permeable a la membrana (su efecto puede estudiarse *in vivo*), que polimeriza actina y estabiliza los microfilamentos (Bubbs *et al.*, 2000). El efecto de la droga en el parásito se evaluó inicialmente con ensayos western blot para detectar actina en fracciones soluble e insoluble de epimastigotes tratados con la droga (5 μ M). Si la droga tiene un efecto polimerizante importante, se esperaría un aumento de actina en la fracción insoluble, sin embargo, no observamos diferencias importantes entre los resultados de las inmunodetecciones de actina o actina - α tubulina entre muestras de parásitos tratados o no tratados con JAS (Figura 7).

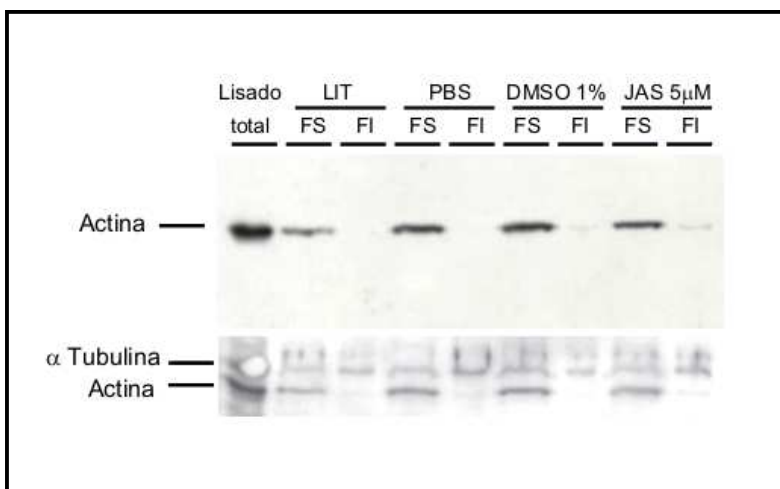


Figura 7. Western blot, tratamiento con JAS. Inmunolocalización de actina, y actina junto con α tubulina en lisados totales de epimastigotes de *T. cruzi* en fracciones soluble (FS) e insoluble (FI) de parásitos incubados en medio LIT, en PBS, en DMSO 1 %, y con JAS 5 μ M.

Posteriormente, epimastigotes tratados con esta misma concentración de JAS se procesaron para MET (Cuadro E). En las micrografías no se pudieron apreciar cambios evidentes en la ultraestructura de los epimastigotes tratados con JAS con respecto a los no tratados (Figura 8). Finalmente, se observó durante una semana con un microscopio invertido, cultivos de epimastigotes (10×10^6 células en 100 μ l) tratados con concentraciones de 0.1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M y hasta de 25 μ M. No se vio afectada la viabilidad ni el movimiento de los parásitos. Estos datos parecieran indicar que JAS no tiene un efecto importante en los epimastigotes de *T. cruzi*. Sin embargo, para afirmar esto, será necesario repetir el efecto de las diferentes concentraciones de JAS con otras densidad de parásitos.

Cuadro E.

MET de epimastigotes tratados con JAS.

MET de epimastigotes tratados con JAS:

10 X10⁶ epimastigotes en fase ML se centrifugaron a 500 xg durante 6 min. Se lavaron dos veces con PBS pH 7.4. Se resuspendieron en 1ml de medio LIT sin suero junto con 120 µl de BSA-oro (25 nm) y 5 µM de JAS. Se incubó durante 30 min a 28 °C. Las muestras se procesaron para MET: los epimastigotes se lavaron 2 veces con PBS pH 7.4 frío, y se centrifugaron a 500 xg durante 6 min; se adicionó al pellet 1ml de fijador Karnovsky (paraformaldehído 4 % y glutaraldehído 1 % en buffer de cacodilato) y se dejó incubando durante 2 hr a 4 °C; posteriormente se lavó dos veces con el buffer de cacodilato frío (sin centrifugar), y finalmente se le aplicó al pellet el buffer de cacodilato frío. El pellet se deshidrató con etanol al 70 % (30 min, 2 veces), y luego con etanol al 100 % (30 min, 2 veces) a TA. Se impregnó con LR-White durante 1 hr 2 veces a TA. Se aplicó LR-White y se dejó incubando ON. a TA. Se cambió la resina por nueva, y se polimeriza durante 24 hr a 60 °C (estufa). Se realizan cortes ultrafinos de cada muestra, y se montan sobre gradillas de cobre. Se tiñen con acetato de uranilo. Se evitó utilizar citrato de plomo porque forma precipitados que impiden la visualización de las partículas de oro (se forman muchos precipitados de plomo).

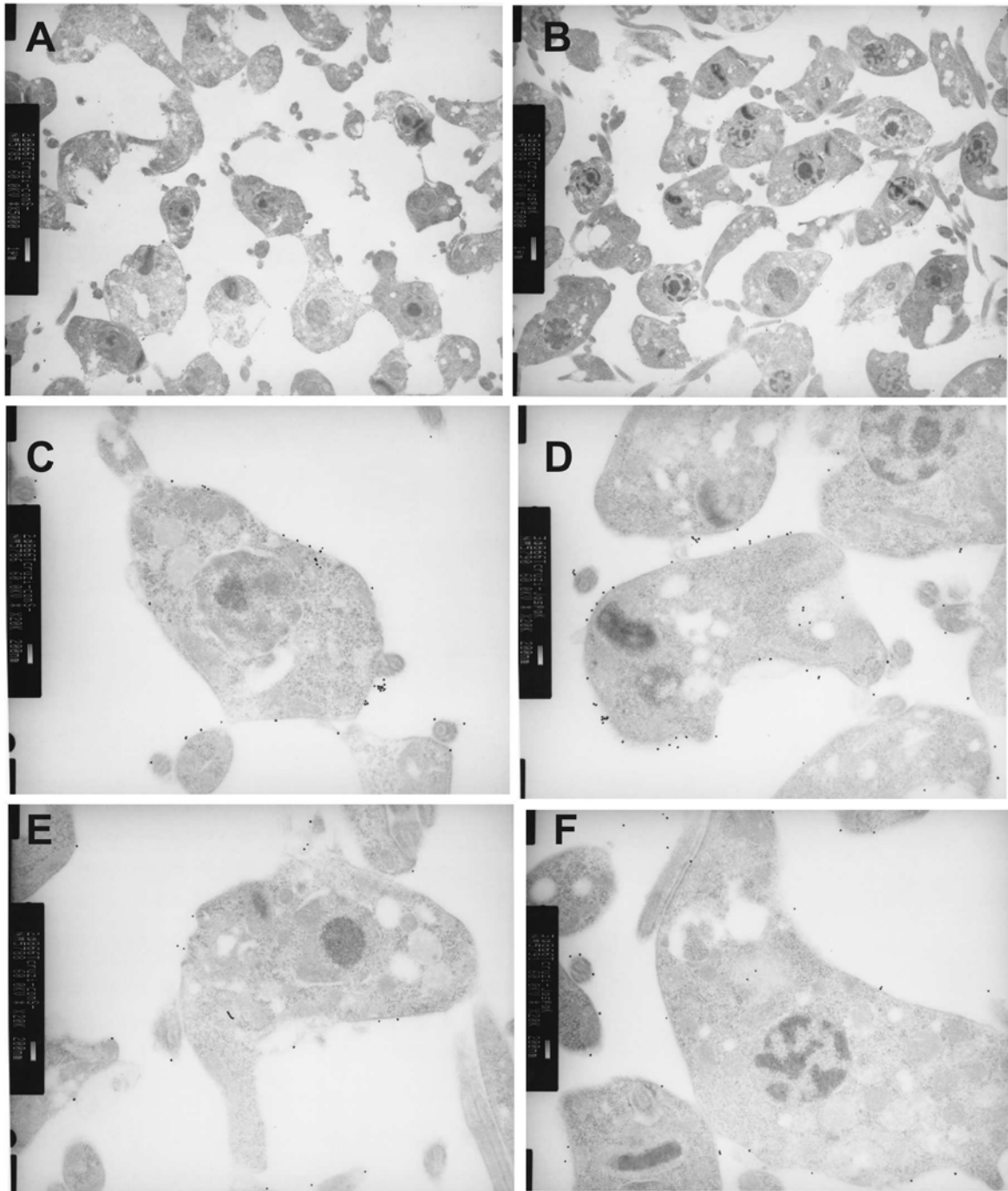


Figura 8. Micrografías de MET (aumento: A y B, 5kX; y C a F, 20kX), tratamiento con JAS. Epimastigotes incubados con BSA-oro durante sin (A, C, E) o con JAS 5 μ M (B, D, F) durante 30 min. Fijación con Karnovsky e inclusión con LR-White. A y B. Fijación con Karnovsky, sin post-fijar, inclusión con LR-White y contraste con acetato de uranilo. Este experimento se realizó en paralelo y siguiendo las condiciones de los ensayos de endocitosis con MET, por eso, los parásitos fueron incubados con BSA-oro.