



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN  
GENE ATÍPICO DE ACTINA DE  
*Trypanosoma cruzi*

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA

Josefina Mata Vadillo

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. Ana María Cevallos Gaos**

MÉXICO, D.F.

Diciembre, 2009



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 26 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **MATA VADILLO JOSEFINA** con número de cuenta **508011762** con la tesis titulada "**CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GENE ATÍPICO DE ACTINA DE *Trypanosoma cruzi***", realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Vocal: DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ  
Secretario: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS  
Suplente: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ  
Suplente: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO

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

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de noviembre de 2009.

  
**Dr. Juan Muñoz Farfán**  
Coordinador del Programa

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de formarme como Maestra en Ciencias; especialmente al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por permitirme ser parte de su programa y por todos los medios ofrecidos para enriquecer mi formación.

Al apoyo recibido de CONACYT (210507)

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por brindarme la infraestructura necesaria, en especial al Dr. Roberto Hernández por su generosidad al permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, bajo la tutoría de la Dra. Ana María Cevallos Gaos.

A mi comité tutorial

A mi asesora, la Dra. Ana María Cevallos Gaos

Al Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández

A la Dra. Rebeca Manning Cela

Gracias por sus enseñanzas, guía y apoyo a lo largo del proyecto.

## Agradecimientos

A los miembros del jurado que amablemente revisaron mi tesis y contribuyeron a su mejoría y enriquecimiento: Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Ana María Cevallos Gaos, Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández, Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández y Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Se agradece el apoyo técnico de la M. en C. Juliana Herrera.

A la Dra. Imelda López Villaseñor por sus valiosos comentarios y sugerencias en los seminarios de grupo.

Agradezco a la Dra. Manning por todas sus sugerencias y apoyo en el desarrollo del proyecto.

A los miembros del laboratorio B142 y B143 del Instituto de Investigaciones Biomédicas, nueva sede, por su compañerismo, amistad y apoyo.

A todas las personas que han contribuido tanto a mi formación académica como personal.

Finalmente quiero agradecer de manera muy especial a mi tutora la Dra. Ana María Cevallos, por ser una excelente maestra, guía y amiga.

*A mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo incondicional*

<b>1. Resumen en español.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Introducción</b>	
3.1. Enfermedad de Chagas.....	3
3.2. Generalidades de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
3.3. Proyecto del genoma.....	6
3.4. Ciclo de vida.....	7
3.5. Estructura celular.....	9
3.6. Organización génica y regulación de la expresión.....	10
3.7. Citoesqueleto.....	11
3.8. Actina.....	13
3.8.1. Proteínas moduladoras de la actina.....	15
3.8.2. Proteínas parecidas a actina ( <i>Actin-like proteins</i> ).....	17
3.8.3. Proteínas relacionadas a actina ( <i>Actin Related Proteins, ARPs</i> ).....	18
3.9. El citoesqueleto de <i>T. cruzi</i> .....	18
<b>4. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>21</b>
<b>5. Metodología</b>	
5.1. Cultivo de parásitos.....	22
5.2. Obtención de DNA.....	22
5.2.1. <i>DNA plasmídico</i> .....	22
5.2.2. <i>DNA genómico</i> .....	23
5.3. Obtención de RNA.....	24
5.4. Amplificación mediante PCR.....	24
5.4.1. <i>Amplificación de la sonda homóloga</i> .....	25
5.4.2. <i>Amplificación del locus de las isoformas</i> .....	25
5.4.3. <i>Amplificación de la región codificadora del Alelo</i> .....	26
5.5. Clonación	
5.5.1. <i>Vector Zero Blunt® TOPO® de (invitrogen)</i> .....	26
5.5.2. <i>pGEM®-T Easy Vector</i> .....	27
5.5.3. <i>pGEX-3x</i> .....	27
5.6. Purificación de fragmentos de un gel de agarosa.....	28
5.7. Elaboración de una sonda radiactiva.....	28
5.8. Southern blot.....	29
5.9. Northern blot.....	30
5.10. Expresión de la proteína.....	30
5.11. Estandarización de la purificación de la proteína.....	30
5.11.1. <i>Pruebas de solubilidad</i> .....	30
5.11.2. <i>Sustraer el sarkosyl de la muestra</i> .....	31
5.11.3. <i>Unión a sefarosa</i> .....	31
5.11.4. <i>Recuperar la proteína de interés</i> .....	32
5.12. Obtención de Anticuerpos.....	32

5.13. Western blot.....	33
5.14. Dot-Blot.....	34
5.15. Adsorción del suero con GST.....	35
5.16. Análisis bioinformáticos.....	35
5.16.1. <i>Búsqueda de secuencias</i> .....	35
5.16.2. <i>Alineación de secuencias</i> .....	35
5.16.2.1. <i>DNA</i> .....	35
5.16.2.2. <i>Proteínas</i> .....	36
5.16.3. Modelaje tridimensional.....	36
<b>6. Resultados</b>	
6.1. Obtención de la sonda homóloga.....	37
6.2. Caracterización de la situación genómica.....	38
6.3. Clonación del locus.....	41
6.4. Caracterización de las clonas.....	42
6.5. Análisis de secuencia.....	44
6.6. Especificidad de la sonda de AcL-4.....	49
6.7. Expresión a nivel de mRNA.....	50
6.8. Subclonación del gene AcL-4.....	51
6.9. Expresión de la proteína.....	52
6.9.1. <i>Purificación de la proteína</i> .....	53
6.9.2. <i>Estandarización del protocolo de purificación</i> .....	54
6.10. Inoculación del conejo.....	55
6.11. Caracterización del suero policlonal.....	55
6.12. Dot.Blot.....	60
<b>7. Discusión</b> .....	61
<b>8. Conclusiones</b> .....	65
<b>9. Perspectivas</b> .....	66
<b>10. Bibliografía</b> .....	67



<b>1. Tablas</b>	
1.1. Vectores en México.....	4
1.2. Taxonomía de <i>T. cruzi</i> .....	5
1.3. Oligonucleótidos utilizados.....	24
1.4. Condiciones de amplificación de la sonda homóloga.....	25
1.5. Condiciones de amplificación del locus de las isoformas.....	26
1.6. Condiciones de amplificación de la región codificadora.....	26
1.7. Inmunización del conejo.....	33
1.8. Condiciones de los estudios de inmunoquímica.....	34
1.9. Proteínas con mayor similitud a las variantes alélicas de AcL-4.....	45
1.10. Resumen de la búsqueda de dominios y motivos conservados en la secuencia de AcL-4.....	45
1.11. Comparación entre actina de <i>T. cruzi</i> , actina de <i>L. major</i> y AcL-4.....	49
<b>2. Figuras</b>	
2.1. Historia evolutiva de <i>T. cruzi</i> .....	6
2.2. Morfologías de <i>T. cruzi</i> .....	8
2.3. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	9
2.4. Estructura celular de <i>T. cruzi</i> .....	10
2.5. Filamentos del citoesqueleto.....	13
2.6. Actina.....	14
2.7. Filamento de actina.....	15
2.8. Proteínas moduladoras de la actina.....	17
2.9. Dinámica de la actina en <i>T. cruzi</i> .....	19
2.10. Secuencia Tens 1183.....	37
2.11. Sonda.....	38
2.12. Secuencias alineadas de las variantes alélicas.....	39
2.13. Contexto genómico de las variantes alélicas y Southern blot.....	41
2.14. Protocolo para la clonación de AcL-4 y sus regiones reguladoras.....	42
2.15. Fotografía del gel en el que se caracterizaron las clonas.....	43
2.16. Southern blot de las clonas.....	43
2.17. Actina de <i>Trypanosoma cruzi</i> alineada con Actin like-4.....	46
2.18. Modelo estructural de AcL-4.....	47
2.19. Modelo estructural de Actina de <i>T. cruzi</i> , actina de <i>L. major</i> y AcL-4.....	49
2.20. Foto de un gel en donde se demuestra la especificidad de las sondas de actina y AcL-4.....	50
2.21. Northern blot.....	51
2.22. Subclonación en el vector de expresión pGEX-3x.....	52

2.23. Proteína recombinante Gst-AcL-4 inducida.....	53
2.24. Ensayos de solubilización de la proteína.....	54
2.25. Purificación de la proteína.....	55
2.26. Ensayo de inmunoquímica contra la proteína recombinante.....	56
2.27. Ensayo de inmunoquímica contra r-Actina y r-AcL-4.....	56
2.28. Ensayo de inmunoquímica contra las proteínas GST, GST-AcL-4 y GST-Actina con el suero policlonal contra AcL-4 y AcL-4 adsorbido.....	57
2.29. Ensayo de inmunoquímica contra extractos proteicos totales de <i>T. cruzi</i> .....	58
2.30. Inmunoquímica de proteínas totales de <i>Trypanosoma cruzi</i> en distintos estadios.....	
2.31. Estudios de inmunoquímica en extractos protéicos de citoplasma y de núcleo.....	59
2.32. Ensayos tipo dot blot con parásitos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	59
	60

---

---

## Clonación y Caracterización de un Gene Atípico de Actina de *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo de divergencia temprana que causa la enfermedad de Chagas en humanos. Debido a su evolución independiente de otros linajes de protozoarios, los tripanosomas presentan mecanismos, estructuras y organelos únicos. El citoesqueleto de estos organismos es peculiar; ya que parece tener una dependencia reducida en la red de actina, pues su citoesqueleto está basado principalmente en tubulina.

En el laboratorio se tiene interés en determinar la estructura y función de la familia de actinas en *T. cruzi*. Inicialmente se identificaron varias secuencias parciales que codifican para dos tipos diferentes de actina, en una base de datos de EST de epimastigotes. El primer tipo codifica para una proteína muy similar a la actina convencional, ya reportado por nuestro grupo de trabajo [5]. A diferencia de lo que ocurre en eucariontes superiores, en donde las diferentes isoformas de actina tienen una similitud de aproximadamente 90% entre sí, este segunda tipo de actina posee muy poca similitud en secuencia con la actina convencional; es atípica.

En el genoma de *T. cruzi*, liberado en 2005, se identificó esta secuencia como un gene con dos variantes alélicas perteneciente a la familia de genes que codifican para actina o proteínas similares a actina; este gene está anotado como “*Actin like protein 4*” (AcL-4).

El objetivo general es iniciar la caracterización del gene atípico de actina de *T. cruzi* (AcL-4) y estudiar su expresión, tanto a nivel de mRNA como de proteína en los diferentes estadios de *T. cruzi* y compararlos con la actina convencional.

Se clonó y secuenció un fragmento de 381pb que codifica para una fracción del gene. Este fragmento se utilizó como sonda para la caracterización de la situación genómica del gene de AcL-4 en *T. cruzi* CL Brener y para confirmar su expresión a nivel de mRNA en los distintos estadios del parásito. Se clonaron y secuenciaron las dos variantes alélicas del gen, una de las variantes fue subclonada en un vector de expresión, que al inducir su expresión se obtiene una proteína fusión GST-AcL-4. Se purificó la proteína y se inoculó en un conejo para obtener anticuerpos policlonales contra ella. En estudios de inmunquímica, el suero policlonal obtenido reconoce a la proteína recombinante pero no reconoce a la proteína nativa. Esto puede ser debido a las condiciones desnaturizantes del ensayo, debido a la ausencia de la proteína o debido a que la proteína está presente en muy pequeñas cantidades. Para determinar qué está pasando se debe asegurar que el transcrito se traduzca a proteína, para esto se propone hacer ensayos de unión a polisomas; si se ve que el transcrito de interés se une a polisomas, se procederá a la búsqueda de la proteína en los distintos estadios del parásito.

## **Cloning and characterization of an atypical actin gene of *Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* is an early diverging protozoon that causes Chagas disease in humans. Due to their independent evolution from other protozoan lineages, trypanosomes have unique mechanisms, structures and organelles. The cytoskeleton of these organisms is peculiar, as it seems to have a reduced dependence in the actin network, since his cytoskeleton is primarily based on tubulin.

The laboratory's interest is to determine the structure and function of the actin family proteins in *T. cruzi*. Initially, several partial sequences that codify for two different types of actin were found in an Expressed Sequence Tag database of epimastigotes. The first type codes for a protein very similar to conventional actins, and it has already been reported by our group [5]. Unlike actin isoforms of complex eucariotes that have a similarity of around 90%, the second actin type has few homologies in sequence with the conventional actin, it is atypical.

In the genome database, released in 2005, we identified this sequence as a gene with two allelic variants, belonging to the actin gene family; this gene is annotated as “*Actin like protein 4*” (AcL-4).

The objective of this work was to start the characterization of the atypical actin gene of *T. cruzi* AcL-4 and study its expression in the different stages of *T. cruzi*'s life cycle and to compare them with the conventional actin.

We amplified and sequenced a 381 bp fragment which codifies for a gene fragment. We used this fragment as a probe to characterize the genomic situation of the gene AcL-4 in *T. cruzi* strain CL Brener and to confirm mRNA expression in the different life cycle stages of the parasite. We cloned and sequenced the two allelic variants of the gene; one of the variants was cloned in an expression vector, that when it is induced, produces a fusion protein GST-AcL-4. We purified the protein, inoculated it into a rabbit in order to obtain a polyclonal antibody against it. In Western blot essays, the antibody identifies the recombinant protein; but it does not identify the native protein. This can be due to the denaturalizing conditions of the Western blot assay, to the absence of the protein, or to small amounts of protein. To determine the reason, we must assure that the transcript is translating to protein, for this we propose to do polysome-binding assays and if we find that the transcript binds to polysomes; we will proceed searching the protein in the different life cycle stages of the parasite.

## 1. Enfermedad de Chagas

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, puesto que es endémica de este continente. Esta enfermedad recibe su nombre en honor al Dr. Carlos Chagas, médico brasileño que en 1909 describió la enfermedad, identificó al organismo causante de ésta (dándole el nombre de su profesor el Dr. Oswaldo Cruz) y también describió el ciclo de vida del protozoo.

La tripanosomiasis americana es una zoonosis muy compleja, transmitida por vectores (Cuadro 1), que está presente en todo el territorio de Sudamérica, Centroamérica y México, y representa una grave amenaza para la salud en estos países. El parásito se presenta en una variedad de cepas e infecta 150 especies de 24 familias de animales domésticos y silvestres. La existencia de la enfermedad de Chagas humana es un hecho en gran parte accidental, en la medida en que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos, forzó a los triatómidos infectados (vectores de la enfermedad) a ocupar viviendas humanas, se llevó a cabo el proceso de domiciliación y, así, encontraron refugio y alimento en la sangre humana y de animales domésticos. De esta manera, el hombre comenzó a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas [6].

Esta enfermedad asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda se encuentra ampliamente difundida, principalmente, en las áreas rurales de todo el continente latinoamericano. Está considerada como la enfermedad parasitaria con mayor carga económica en América Latina debido a su prolongada cronicidad [6].

### Vectores en México

**Nombres comunes:** chinche hocicona, chinche besucona, chinche asesina, vinchuca, chinche gaucha

**Descripción:** Insectos pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae del orden hemiptera. Miden aproximadamente 2.5 centímetros de longitud, su color varía entre el café y el gris. Poseen piezas bucales perforadoras y chupadoras que forman un pico situado en la parte central de la cabeza; dirigido ventral y posteriormente (Ruppert, 1996). Son hematófagos. Se alimentan de la sangre de humanos, pequeños roedores, tlacuaches, armadillos y zarigüeyas. En México los vectores más importantes son: *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barbieri*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma picturata* y *Rhodnius prolixus* [1-3].



*Triatoma dimidiata*

#### Sistemática de triatómidos

Reino	Animalia
Phyllum	Artropoda
Clase	Insecta
Orden	Hemiptera
Familia	Reduviidae
Subfamilia	Triatominae
Género	Triatomidae

**Distribución:** México, zonas menores a 1,800 metros sobre el nivel del mar, principalmente en la vertiente del Pacífico [4].

**Hábitat:** Los triatómidos viven cerca de asentamientos humanos. Se esconden en grietas, techos de paja y lugares similares

**Hábitos:** Nocturnos. Se alimentan de sangre humana u otros animales de sangre caliente (roedores, armadillos, tlacuaches)

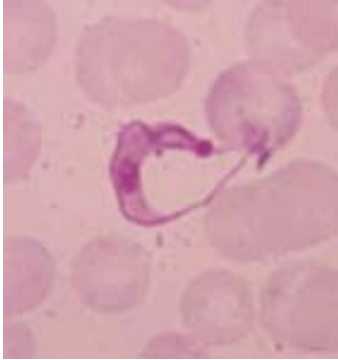
*Cuadro 1* Vectores de la enfermedad de Chagas en México

## 2. Generalidades de *T. cruzi*

*T. cruzi* (Chagas, 1909) es un protozoo flagelado, muy evolucionado y altamente especializado [7]; que presenta mecanismos, estructuras y organelos únicos; lo que los hace organismos interesantes de estudiar.

La clasificación taxonómica de los protozoa es controversial; se han propuesto la existencia de varios grupos monofiléticos de los cuales se desconoce su relación evolutiva. En este trabajo se ha utilizado la clasificación taxonómica de *T. cruzi* propuesta por Cavalier-Smith (Cuadro 2). De acuerdo a esta clasificación *T. cruzi* pertenece a la familia trypanosomatidae, en la que encontramos a tres organismos con una gran importancia médica: *T. cruzi* que ocasiona la enfermedad de Chagas que es una zoonosis endémica del continente

americano, *Trypanosoma brucei* que causa la enfermedad del sueño y es endémica del continente africano y *Leishmania spp.* que causa tres tipos de leishmaniasis: visceral, cutánea y muco-cutánea; y es de distribución mundial.

<b>Dominio</b>	Eucaryota	
<b>Reino</b>	Protozoa	
Sub reino	Biciliata	
<b>Infra Reino</b>	Excavata	
<b>Phylum</b>	Euglenozoa	
<b>Sub phylum</b>	Saccostoma	
<b>Clase</b>	Kinetoplastea	
<b>Orden</b>	Trypanosomatida	
<b>Suborden</b>	Trypanosomatina	
<b>Familia</b>	Trypanosomatidae	
<b>Género</b>	Trypanosoma	
<b>Subgénero</b>	Schizotrupanum	
<b>Especie</b>	cruzi (Chagas, 1909)	

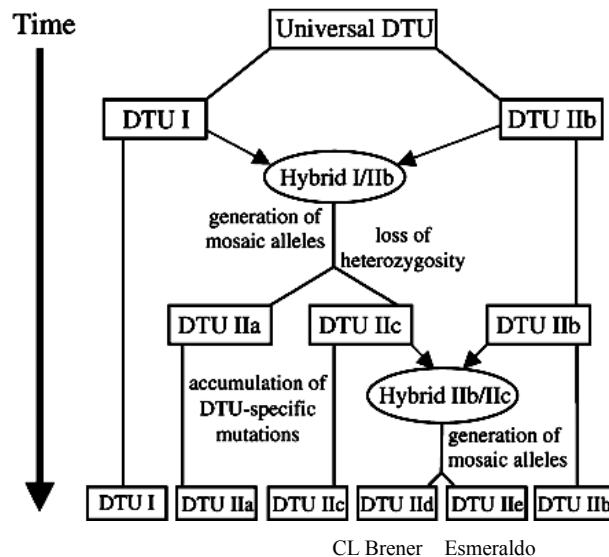
*Classificación de Cavalier-Smith, 2004*

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/img/tres.jpg>

**Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *T. cruzi*** La taxonomía es una de las ramas que más ha evolucionado ya que antiguamente se utilizaban esencialmente características morfológicas para la clasificación de los organismos, pero recientemente con el rápido incremento de herramientas de biología molecular y celular, existen varias propuestas taxonómicas basadas en estas herramientas para clasificar a un grupo tan variado como son los protozoarios. La clasificación que mostramos es la de Cavalier-Smith[8].

A pesar de que la reproducción de *T. cruzi* es clonal, durante mucho tiempo se ha observado una gran variabilidad de características biológicas entre las cepas de *T. cruzi*; probablemente esto esté asociado con su amplio rango de hospederos. De hecho *T. cruzi* puede infectar una gran variedad de mamíferos y triatómidos y puede infectar virtualmente a todos los tipos celulares [9]. Mediante técnicas moleculares y bioquímicas se ha demostrado esta variabilidad, por lo que se han podido dividir en dos linajes principales: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II [10-13]. *T. cruzi* I se encuentra predominantemente asociado con el ciclo selvático de transmisión y *T. cruzi* II está comúnmente asociado al ciclo de transmisión doméstica [14]. El linaje *T. cruzi* II se ha subdividido en cinco subgrupos: IIa, IIb, IIc, IId y IIe [15] que se cree fueron el resultado de dos eventos de hibridación, separados por eventos de evolución

clonal (Figura 1). Estos eventos generaron cepas híbridas clasificadas como subgrupos IId y IJe [16].



Westenberger et al. 2005

**Figura 1. Historia Evolutiva de *T. cruzi* propuesta por Westenberger, 2005 [16].** La estructura actual de la población de *T. cruzi* revela dos eventos de hibridación separados por periodos de evolución clonal. Se cree que hubo evolución clonal de dos linajes (DTU I y DTU IIb) de un ancestro común (universal DTU). El primer evento de hibridación fue una fusión entre los DTU's ancestrales, resultando en una progenie híbrida en la que se pudo formar mosaicismos en los alelos. La pérdida de la heterocigocidad en la progenie siguió de evolución clonal independiente para originar DTU IIa y DTU IIc. Es posible que los DTU's IIa y IIc se originaran independientemente, pero no es probable ya que estos dos linajes comparten varios polimorfismos. Una segunda hibridación entre el IIb y IIc generó los DTU's IId y IJe. Y al igual que en la hibridación anterior se perdió la homocigocidad.

### 3. Proyecto del genoma

En el año 2005 se publicó en la revista *Science* el proyecto del genoma de los tres tripanosomátidos con mayor importancia médica: *Leishmania major* [17], *Trypanosoma brucei* [18] y *T. cruzi* [19]. También se publicó un artículo sobre el proteoma de *T. cruzi* [20].

El proyecto del genoma de *T. cruzi* es el resultado de un esfuerzo conjunto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Seattle (SBRI), la Universidad de Uppsala, el Instituto Karolinska y el Instituto para la Investigación Genómica (TIGR). En donde se secuenció,



ensambló y anotó el genoma de *T. cruzi*. De un genoma diploide de ~180 Mb aproximadamente 60.4Mb han sido anotadas. Los datos secuenciados se encuentran en GenBank

La cepa CL Brener fue utilizada para el proyecto del genoma ya que era la cepa mejor caracterizada experimentalmente [21]. Durante el desarrollo del proyecto del genoma de *T. cruzi* se hizo evidente que la cepa CL Brener es un híbrido del subgrupo IIb y IIc (que a su vez es híbrido entre *T. cruzi* I y *T. cruzi* IIb), por lo que fue necesario incluir las secuencias correspondientes a todo el genoma diploide. Se sabe que una de las cepas progenitoras pertenece al subgrupo IIb (Esmeraldo), por lo que se compararon las secuencias obtenidas con aquellas correspondientes a la cepa Esmeraldo, para poder denominarlas Esmeraldo y de no corresponder a este subgrupo se denominaron No Esmeraldo (Figura 1).

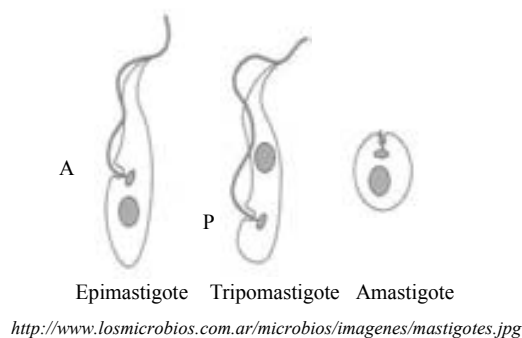
Debido a que mas del 50% del genoma de *T. cruzi* está conformado por secuencias repetidas, no fue hasta recientemente que se pudieron ensamblar los 41 pares de cromosomas de *T. cruzi* [22].

#### **4. Ciclo de vida**

*T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo en el que alterna entre un vector invertebrado (insecto de la familia Reduviidae) y un hospedero vertebrado (mamífero). Este protozoario es capaz de adaptarse a los distintos ambientes donde se lleva a cabo su ciclo de vida, a través del proceso de diferenciación celular. Estas transformaciones adaptativas se llevan a cabo mediante cambios coordinados en morfología, metabolismo y regulación del ciclo celular. Durante sus diferentes estadios, se pueden ver perfiles muy distintos de RNA y proteínas; que son el resultado de mecanismos inusuales de regulación de expresión génica [23].

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* presenta tres morfologías que pueden ser diferenciadas entre si mediante la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo y el lugar de donde emerge el

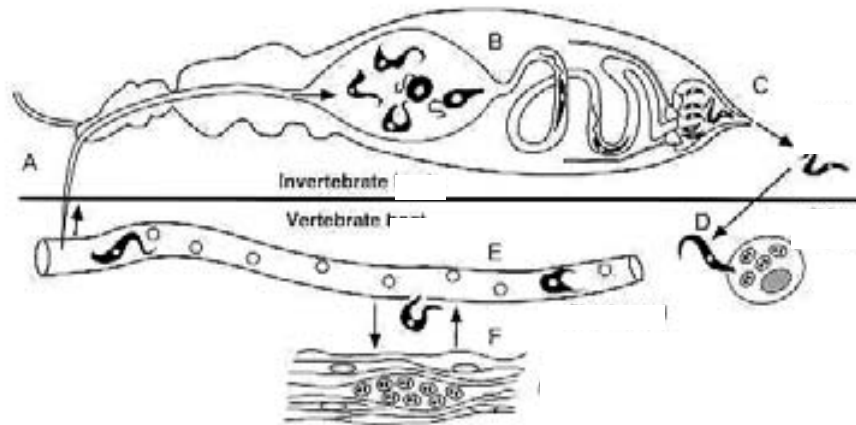
flagelo (Figura 2). Las tres morfologías son: epimastigote, tripomastigote y amastigote. Los tripomastigotes pueden ser sanguíneos, localizados en el torrente sanguíneo del hospedero o metacíclicos, localizado al final del tracto digestivo del vector; su morfología es la misma.



**Figura 2. Diagrama representativo de las morfologías de *T. cruzi*.** Epimastigotes: *el cinetoplasto y el inicio del flagelo se localizan en posición anterior (A) al núcleo.* Tripomastigotes: *el cinetoplasto se encuentra en la parte posterior (P) del parásito y consecuentemente del núcleo, el flagelo emerge del bolsillo flagelar localizado junto al cinetoplasto.* Amastigotes: *son formas redondeadas que poseen un flagelo corto.*

El ciclo de vida, comienza cuando una chinche se alimenta de la sangre de un vertebrado infectado con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (identificado en la figura 3 como **A**). En el intestino del vector estos se diferencian a epimastigotes, los cuales se dividen repetidamente mediante fisión binaria (**B**). Al llegar a la cloaca una cierta proporción de parásitos se transforman en tripomastigotes metacíclicos los cuales son eliminados en las heces al momento en que se alimenta el vector (**C**). Los tripanosomas entran al vector a través de la herida de la picadura o a través de mucosas e invaden las células hospederas (**D**). La forma metacíclica, no proliferativa, es capaz de infectar un amplio rango de células. El tripomastigote entra a las células en una membrana parasitófora, donde comienza a diferenciarse en amastigote, escapa de la vacuola y en el citoplasma, pierde su flagelo, se termina de diferenciar en amastigote y prolifera hasta que la célula está llena de estas formas redondeadas. En este punto los parásitos comienzan a alargarse, recuperan su flagelo y se

transforman en tripomastigotes sanguíneos, rompen la célula y regresan al torrente sanguíneo donde infectan a más células (E, F) [24].

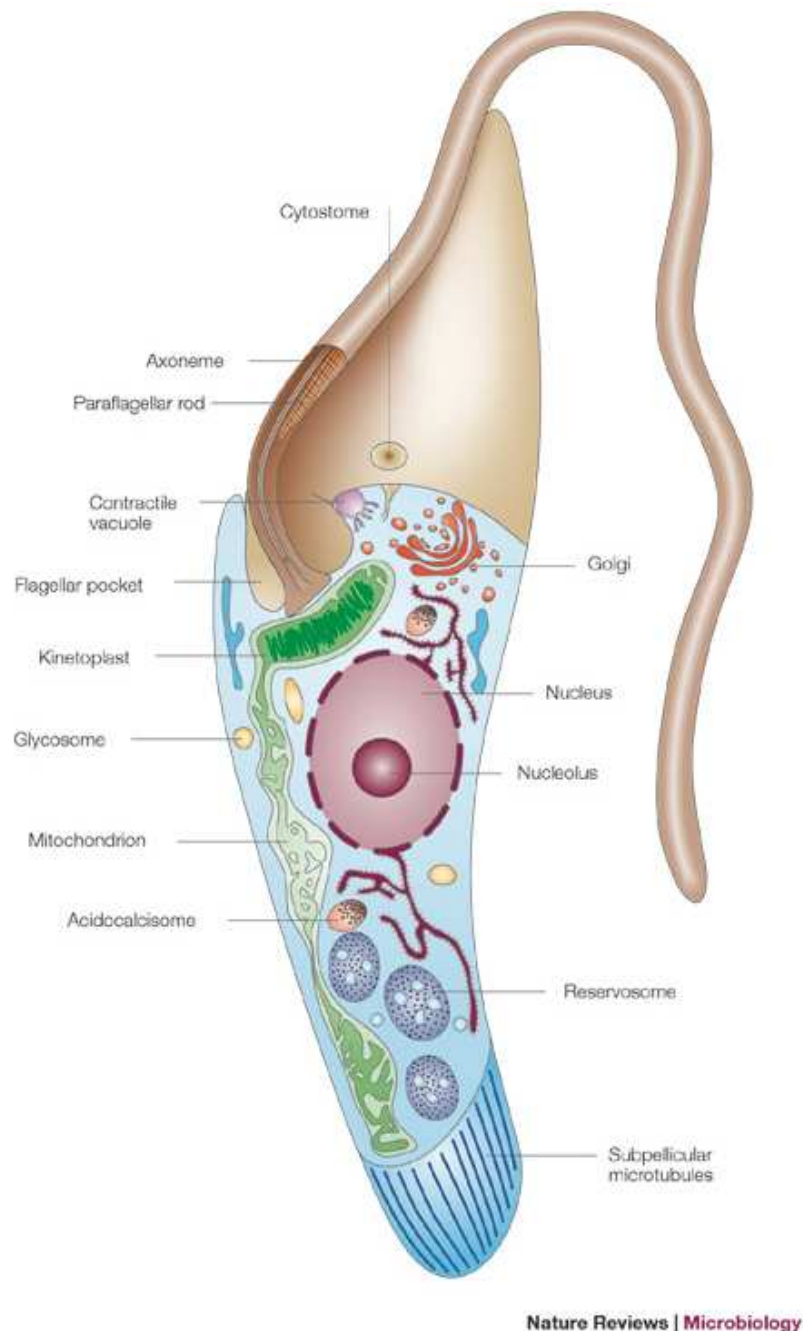


**Figura 3. Ciclo de Vida de *T. cruzi*.** A). En el intestino del vector estos se diferencian a epimastigotes, los cuales se dividen repetidamente mediante fisión binaria (B) Al llegar a la cloaca una cierta proporción de parásitos se transforman en tripomastigotes metacíclicos los cuales son eliminados en las heces al momento en que se alimenta el vector (C). Los tripanosomas entran al vector a través de la herida de la picadura o a través de mucosas e invaden las células hospederas (D). La forma metacíclica, no proliferativa, es capaz de infectar un amplio rango de células. Entra a las células en una membrana parasitófora, donde comienza a diferenciarse en amastigote, escapa de la vacuola y en el citoplasma, pierde su flagelo, se termina de diferenciar en amastigote y prolifera hasta que la célula está llena de estas formas redondeadas. En este punto los parásitos comienzan a alargarse, recuperan su flagelo, se transforman en tripomastigotes sanguíneos, rompen la célula y regresan al torrente sanguíneo donde infectan a más células (E, F) [25].

[http://gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig82\\_3.JPG](http://gsbs.utmb.edu/microbook/images/fig82_3.JPG)

## 5. Estructura celular

*T. cruzi* presenta estructuras celulares peculiares (figura 4) entre las que destacan: un citoesqueleto constituido por un corset subpelicular de microtúbulos adheridos en toda la membrana citoplasmática excepto en el área correspondiente al bolsillo flagelar. El bolsillo flagelar que es el único lugar por el cual se lleva a cabo intercambio de material entre el interior y exterior de la célula. Los reservosomas: vesículas que contienen lípidos y proteínas, originadas mediante la fusión de vesículas endocíticas. Cinetoplasto: DNA circular concatenado en su única mitocondria.



**Figura 4. Representación esquemática de un epimastigote de *T. cruzi* en donde se encuentran indicadas las principales estructuras celulares.**

<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n3/images/nrmicro1097-f1.jpg> [26]

## 6. Organización génica y regulación de la expresión

En tripanosomátidos las regiones codificadoras están organizadas en tándem, separadas por regiones intergénicas pequeñas (de 100 a 400 nucleótidos). Los genes se transcriben policistricamente [27]. En *T. cruzi* la expresión génica es principalmente regulada

postranscripcionalmente. Los RNA mensajeros (mRNA) maduros provienen del procesamiento de transcritos policistrónicos mediante trans-splicing a través de la adición de un spliced leader común con un cap inusual en el extremo 5' y poliadenilación en el extremo 3' de cada transcrito [28]. Los transcritos individuales de un policistrón, en general no están asociados en alguna vía metabólica, consecuentemente deben operar diversos mecanismos para controlar la apropiada expresión de los mRNA. Algunos mecanismos utilizados por *T. cruzi* para regular la expresión génica son: la expresión diferencial del mRNA [29, 30], la accesibilidad de la maquinaria de traducción al mRNA [31] y los cuerpos-P (P-bodies o Processing-bodies en inglés) que son focos citoplasmáticos bien definidos que secuestran mRNA's maduros para su degradación o almacenamiento [32].

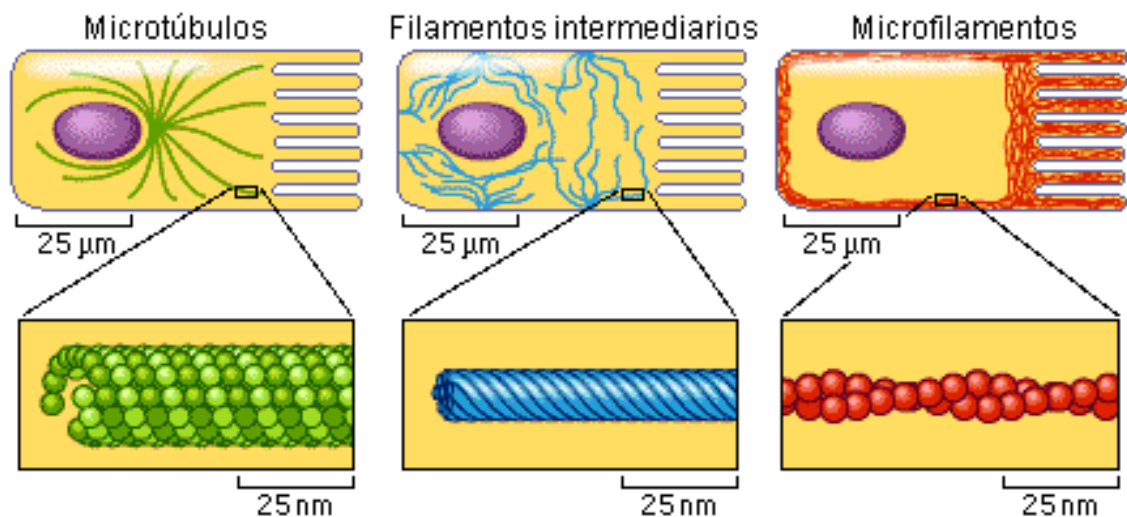
## **7. Citoesqueleto**

Las células tienen que organizarse en el espacio e interactuar mecánicamente con su ambiente. Deben tener una forma propia, estar robustas físicamente y estar bien estructuradas internamente. Muchas células deben ser capaces de reorganizar rápidamente sus componentes internos mientras crecen, se dividen, se adaptan a diversas condiciones, llevan a cabo endocitosis o exocitosis o se adhieren al sustrato. Estas funciones mecánicas y de funcionamiento son llevadas a cabo por un sistema complejo de filamentos y proteínas accesorias llamado citoesqueleto. Su función es particularmente importante en las células animales, donde no existe una pared celular que dé consistencia a las células[33].

Generalmente, el citoesqueleto eucarionte está conformado por tres clases de filamentos: filamentos intermedios, microtúbulos y microfilamentos o filamentos de actina (figura 5). Todos estos filamentos se forman mediante la polimerización de subunidades proteicas. Los microtúbulos y los filamentos de actina se originan de la polimerización de

subunidades de tubulina y de actina respectivamente. Los componentes de los filamentos intermedios son muy diversos y están pobremente conservados en la evolución[34].

Los microtúbulos son cilindros largos y huecos conformados por dímeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, son muy rígidos y tienen la habilidad de adquirir diversas formas lo que permite a la célula llevar a cabo mitosis o regular el transporte intracelular. Los microfilamentos están constituidos por subunidades de actina, que es la proteína celular más abundante en la mayoría de las células eucariontes. Las principales funciones de la actina citoesquelética son la motilidad celular, los cambios morfológicos de la célula a lo largo del ciclo de vida, la organización del citoplasma para generar fuerza motora en respuesta a diversas señales extracelulares, es esencial para la contracción, la adhesión y el transporte intracelular. También se ha encontrado asociada con regiones de la membrana plasmática donde se lleva a cabo la endocitosis [35]. Los filamentos de actina se organizan en haces y retículos; existen retículos corticales adosados a la membrana celular, hay redes de actina que se asocian a microtúbulos en procesos como migración celular, anclaje y transporte vesicular [36]. Las funciones anteriores son posibles debido a las interacciones entre la actina y las proteínas moduladoras. Un ejemplo es la interacción entre la actina y la miosina durante la citocinesis. La actina se encuentra generalmente en el citoplasma, aunque también se ha detectado en el núcleo celular donde se ha implicado en la remodelación de cromatina y en el procesamiento y transporte del mRNA [37, 38].



**Figura 5.** Los tres tipos de filamentos del citoesqueleto de células eucariotas  
<http://www.maph49.galeon.com/celula/Cytoskel.gif>

## 8. Actina

La actina es una proteína de tamaño intermedio (42-kDa), compuesta por 374-376 [39] residuos y pertenece a la superfamilia Actina de proteínas. Estas proteínas se caracterizan por tener una estructura globular con una hendidura en donde se une ATP o ADP y que tiene una actividad intrínseca de ATPasa. A esta súper familia pertenecen también las cinasas del azúcar y las proteínas de choque térmico. De acuerdo a datos cristalográficos, actina es una proteína globular, bilobulada (figura 6). Entre los dos lóbulos tiene un pliegue que es uno de los elementos estructurales más importantes de esta proteína ya que en este sitio se une el ATP y tiene un sitio de alta afinidad a un catión divalente, ya sea Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o Magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). En la ausencia de sal, la actina existe en forma monomérica o globular (actina-G). Al elevar la concentración de sal, los filamentos (actina-F) se forman rápidamente con la inherente hidrólisis de ATP [40]. La actina interactúa con muchas proteínas, incluida ella misma, y como se mencionó anteriormente, este proceso está regulado por proteínas moduladoras de la actina.

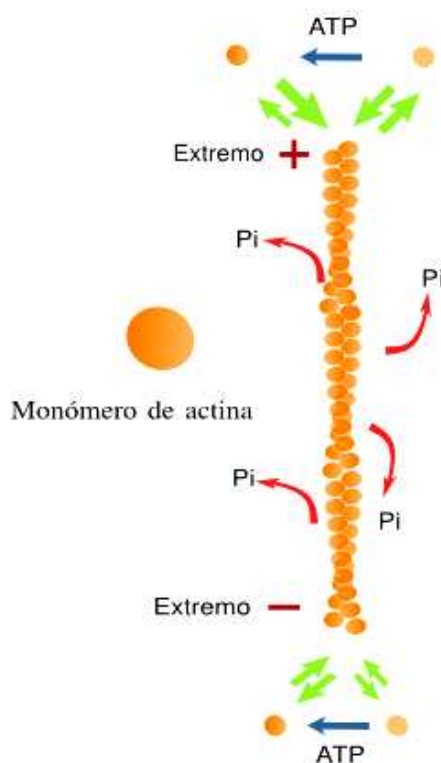


**Figura 6. Estructura de la G-Actina.** El círculo verde representa al catión divalente, también se observa en rojo el ATP unido a la Actina

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d3/Actin\\_with\\_ADP\\_highlighted.png/250px-Actin\\_with\\_ADP\\_highlighted.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d3/Actin_with_ADP_highlighted.png/250px-Actin_with_ADP_highlighted.png)

Los filamentos de actina poseen un extremo más (+) y otro menos (-), es decir, son filamentos polarizados. Ello es consecuencia de la disposición ordenada de las subunidades de actina en el filamento, siempre se ensamblan con la misma orientación (figura 7). El extremo más se denomina así porque en él predomina la polimerización, mientras que en el extremo menos predomina la despolimerización. En la célula se crean y se destruyen filamentos de actina continuamente. Dentro de la célula, la formación de nuevos filamentos es regulada a través de complejos proteicos como las Arp2/3 y las forminas que actúan como centros nucleadores. Esto es tremendamente útil para la célula puesto que permite crear nuevos filamentos allí donde se necesitan. Las condiciones, la concentración de actina y su unión a proteínas moduladoras como profilina y timosina en el citosol impiden que los monómeros se asocien espontáneamente para formar filamentos.





**Figura 7. Esquema de un filamento de actina** donde se muestra como los monómeros de actina se disponen de forma helicoidal. Es una estructura polarizada donde las constantes de asociación y disociación de los monómeros son diferentes en los dos extremos (flechas verdes), aunque en ambos siempre es mayor la constante de asociación para el monómero unido a ATP. Una vez polimerizado, el monómero hidroliza el ATP liberando Pi y quedando por tanto el monómero unido a ADP [33].

### 8.1. Proteínas moduladoras de la actina

Las proteínas moduladoras de la actina afectan a la velocidad de polimerización de los monómeros, así como a la organización tridimensional de los filamentos (figura 8). Estas proteínas moduladoras se pueden clasificar en diferentes tipos:

**a) Las que afectan a la polimerización:** La timosina  $\beta 4$ , se unen a los monómeros de actina libres e impiden su unión a filamentos. La profilina, favorece el ensamblado de actina en presencia de extremos barbados de los filamentos [41] y la retiene en ausencia de estos [42], también favorece el intercambio entre ADP-Actina por ATP-Actina [43].

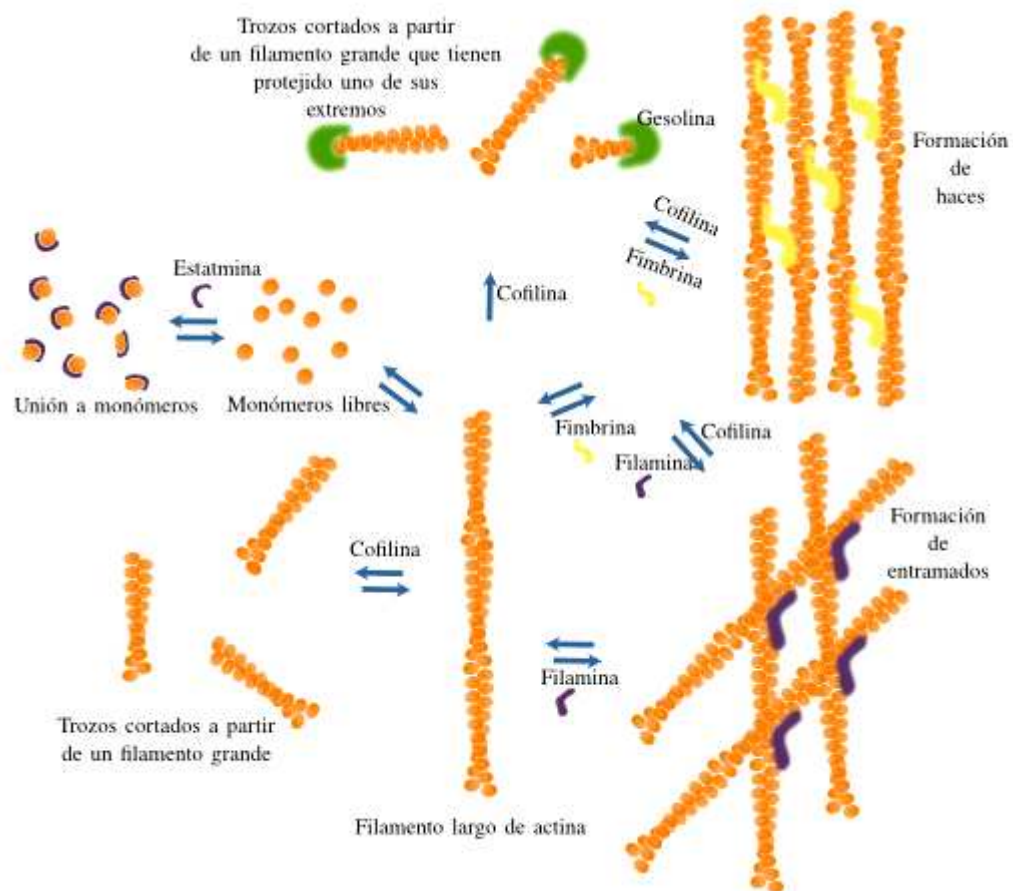
**b) *Proteínas moduladoras***, como las fimbrina y la  $\alpha$ -actinina, que permiten la formación de haces de filamentos de actina mediante el establecimiento de puentes cruzados entre filamentos, mientras otras, como la filamina, permiten la formación de estructuras reticulares.

**c) *Ruptura y remodelación***. Ciertas proteínas moduladoras, como la cofilina y la gelsolina, provocan la ruptura y remodelación de los filamentos de actina;

**d) *Interacción de los filamentos con otras proteínas***. Hay proteínas que median la interacción de los filamentos de actina con otras proteínas relacionadas, como es el caso de la tropomiosina, que media la interacción entre actina y miosina.

**e) *Proteínas de anclaje*** permiten la unión de los filamentos de actina a estructuras celulares como las membranas o a otros componentes del citoesqueleto [33].

Existen ciertos factores que condicionan la acción de estas proteínas moduladoras como: la variación en la concentración de Calcio, proteínas como las Rho-GTPasas, la presencia de lípidos, o la mayor o menor expresión génica de sus mRNA. También hay fármacos que afectan a la polimerización de los filamentos de actina. Por ejemplo, las citocalasinas impiden la polimerización y las faloidinas impiden la despolimerización.



**Figura 8. Proteínas moduladoras de la actina.** La polimerización y depolimerización de los filamentos de actina se ve afectada por numerosas proteínas denominadas moduladoras. En este esquema se muestran algunas de las disposiciones de los filamentos de actina en la célula, así como ejemplos de las moléculas moduladoras que los provocan [33].

El campo de estudio del citoesqueleto ha progresado de considerarlo un andamio rígido, a verlo como una red compleja y dinámica que modula la mayoría de las funciones celulares; incluyendo tráfico de vesículas, transducción de señales y división celular. Comprender totalmente de estos procesos es un gran reto.

## 8.2. Proteínas parecidas a actina (*Actin-like proteins*)

Las características funcionales utilizadas originalmente para identificar actinas incluyen: su capacidad de polimerizarse en presencia de iones de magnesio y concentraciones salinas fisiológicas y la habilidad de estos filamentos para estimular la actividad de ATPasa

de la miosina. La mayoría de las actinas son capaces de unir citocalacinas, falotoxinas y desoxirribonucleasa I (DNasa I). Actualmente con la secuenciación masiva de genomas de microorganismos, y con el constante desarrollo de algoritmos para reconocer elementos en secuencias, se ha encontrado una familia de actinas divergentes que comparten una gran similitud en secuencia, pero se conoce poco su función. Existen reportes de proteínas de procariontes que forman filamentos, activan la ATPasa de la miosina, inhiben a la DNasa, unen faloidina y comparten similitud antigénica con la actina. Debido a que este último grupo de actinas también se expresa en procariontes, las actinas podrían representar una de varias proteínas descendientes de algunos ancestros comunes que unían ATP [44, 45].

### **8.3. Proteínas relacionadas a actina (Actin Related Proteins, ARPs)**

Es una familia de proteínas muy conservada, cuyos miembros tienen cierta similitud en secuencia con las actina convencionales (17 al 60%) [46]. Las ARPs, como las actinas convencionales, poseen la estructura de unión a ATP. Sin embargo, las ARPs tienen características de superficie diversas causadas por inserciones, deleciones y mutaciones sugiriendo que son funcionalmente diferentes de las actinas y diferentes entre sí [40, 47, 48].

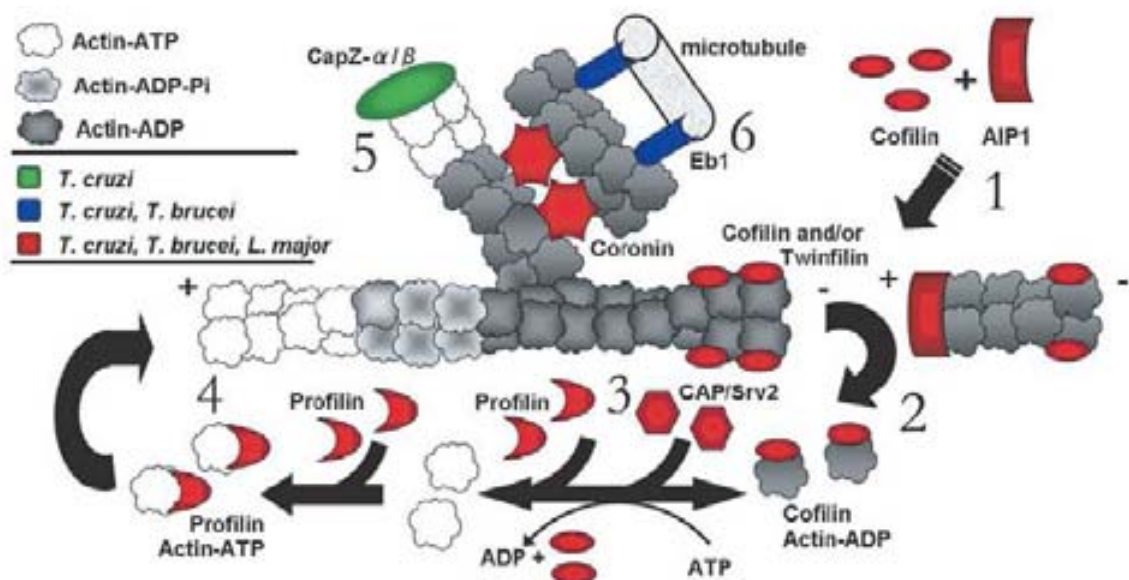
## **9. El citoesqueleto de *T. cruzi***

El citoesqueleto de *T. cruzi* está basado principalmente en tubulina, [18] por lo que la actina no ha recibido la atención que merece. En los tripanosomátidos no existen homólogos para los genes que codifican para las proteínas de los filamentos intermedios [18]. Una de las características sobresalientes de este protozario es el conjunto de microtúbulos subpeliculares que se encuentran adosados a la membrana citoplásmica, conformando un citoesqueleto periférico de gran rigidez. Los microtúbulos subpeliculares se distribuyen en toda la membrana citoplásmica, excepto en el saco flagelar. Esta región carente de

microtúbulos es de gran importancia para la célula, ya que es el único sitio donde se realiza endocitosis y exocitosis de moléculas y la actina puede estar involucrada en este proceso, como se ha descrito en *T. brucei* [49].

Al buscar en el genoma de *T. cruzi* proteínas moduladoras de actina, se vio que este organismo posee las suficientes proteínas para que teóricamente lleven a cabo ensamblado y desensamblado de filamentos (figura 9). En particular las principales proteínas responsables del ensamblaje y desensamblaje de filamentos y de la nucleación parecen estar total o parcialmente conservadas [18, 50].

A continuación se muestra un esquema de la dinámica de la actina en *T. cruzi*.



**Figura 9. Dinámica de la Actina en *T. cruzi*.** Esta se lleva a cabo mediante la acción coordinada de varias proteínas. Los colores de las proteínas moduladoras de la actina representan en qué tripanosomátidos se encuentran. Las señales presentes en los extremos barbados (+) y los extremos puntiagudos (x) de los filamentos. (1) AIP1 y cofilina físicamente cooperan para promover la depolimerización: La Cofilina se une preferencialmente a la ADP-Actina de los filamentos maduros cortándolos y produciendo extremos puntiagudos. AIP1 se asocia con los nuevos extremos barbados producidos por la cofilina, evitando que se vuelvan a unir y potenciando la despolimerización de la actina. La twinfilina también se une a ADP-actina y provee un reservorio de monómeros en el citoplasma. (2) los cortes provocados por la cofilina rápidamente llevan a la acumulación de cofilina unida a los monómeros de ADP-actina. (3) La Profilina y CAP/Srv2 actúan en rondas sucesivas de corte/depolimerización, potenciando el intercambio del ADP unido a actina con ATP. CAP/Srv2 interactúa con monómeros de ADP-actina y los libera catalíticamente para el intercambio del nucleótido mediante el reciclaje de cofilina y promoviendo la despolimerización de los extremos barbados. (4) El intercambio de nucleótidos, ATP por ADP potenciando la unión de profilina a los monómeros. ATP-actina unida a profilina actúan en los extremos barbados sin capping durante las nuevas rondas de ensamblaje. (5) la proteína de capping CapZα/β se une a los extremos barbados y restringe la polimerización y la longitud del filamento, por lo que estabiliza los extremos barbados. (6) las proteínas de cross linking EB1 y coronina actúan como puentes con los microtúbulos [50].

En el laboratorio se tiene interés en determinar la estructura y función del citoesqueleto de actina en *T. cruzi*. Inicialmente se identificaron varias secuencias parciales que codificaban para dos tipos diferentes de actina, en una base de datos de EST de epimastigotes del proyecto del genoma de *T. cruzi* (TIGR). El primer tipo codifica para una proteína muy similar a la actina convencional, ya reportado por nuestro grupo de trabajo[5]. El segundo tipo (clona tens1183) posee muy poca similitud en secuencia con la actina convencional; es atípica y es descrita como actina similar a la actina de *Chlamydomonas reinhardtii*. La presencia de más de una actina en tripanosomátidos no ha sido reportada por lo que se decidió iniciar la caracterización de esta proteína.

## **Hipótesis**

El gene atípico de actina de *T. cruzi* (clona TENS 1183) codifica para una proteína funcional en los distintos estadios del parásito

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Iniciar la caracterización del gene atípico de actina de *T. cruzi* y estudiar su expresión tanto a nivel de RNA como de proteína en los distintos estadios y compararlos con la actina convencional de *T. cruzi*.

### ***Objetivos particulares***

1. Clonar un fragmento del gene para utilizarlo como sonda homóloga en la caracterización de la situación génica y para estudiar la presencia de mRNA en los tres estadios del parásito.
2. Clonar las variantes alélicas del gene atípico de actina de *T. cruzi* cepa Cl Brener, con sus regiones reguladoras río arriba y río abajo, y confirmar la secuencia mediante secuenciación
3. Subclonar una de las copias del gene en un vector de expresión.
4. Expresar y purificar la proteína recombinante para inocular un conejo y obtener anticuerpos policlonales

Estudiar la expresión de la proteína en los distintos estadios del parásito

## **Metodología**

### ***1. Cultivo de parásitos***

En el laboratorio se tienen cultivos axénicos de epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL Brener, que se mantienen en crecimiento logarítmico, en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) a 28°C [51].

### ***2. Obtención de DNA***

#### ***2.1. Lisis alcalina para la obtención de DNA plasmídico [52]***

Se pone un inóculo a crecer en 3 ml de medio LB con antibiótico durante la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente se pone el cultivo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se cosechan las células con una microcentrífuga (Centrifuge 5415D-Eppendorf) a >10,000 g durante 1 minuto, se tira el sobrenadante, y se repite la operación hasta cosechar todas las células. Se purifican los plásmidos mediante lisis alcalina. Este método consiste en lisar las células con una solución alcalina que desnaturaliza el DNA genómico por lo que se precipita junto con los lípidos y proteínas; únicamente las moléculas pequeñas (como DNA plasmídico y RNA) escapan de este precipitado y quedan en solución. Para lograr esto se resuspenden las células cosechadas en 150 µl de solución de resuspensión fría (glucosa 500 mM, Tris-HCl 25 mM pH8 y EDTA 10 mM pH8), se agregan 200 µl de solución de lisis (NaOH 0.2 N y SDS 1%), se mezclan los tubos por inversión (5 veces) y se incuban 3 minutos en hielo. Se agregan 150 µl de solución neutralizante fría (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial al 11% en agua destilada) se mezcla el contenido de los tubos por inversión y se dejan 5 minutos en hielo. Al concluir los 5 minutos se centrifugan los tubos 5 minutos en una microcentrífuga a >10,000 g. El sobrenadante



se pone en un tubo nuevo y se le hace una extracción orgánica. Para esto se agrega un volumen de fenol:cloroformo, se revuelve en el agitador vortex y se centrifuga durante 5 minutos a  $>10,000$  g. Se pasa la fase acuosa a un tubo nuevo teniendo cuidado de no contaminarla con el fenol y cloroformo que están en la fase inferior del tubo, se vuelve a hacer otra extracción orgánica pero únicamente con cloroformo. Después de transferir la fase acuosa a un tubo limpio, se le agregan 2 volúmenes de etanol, se mezcla con el agitador vortex y se deja precipitándose a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Pasado este tiempo se centrifugan las muestras en una microcentrífuga a  $>10,000$  g durante 30 minutos en el cuarto frío a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al terminar este tiempo se tira el sobrenadante y la pastilla se lava con etanol frío al 70%, se pone el tubo invertido sobre una toallita desechable y se deja que se escurran las gotas sobrantes de etanol. Una vez que la pastilla esté seca y el tubo sin gotas, se resuspende el DNA (la pastilla) en  $50\ \mu\text{l}$  de TE con RNasa (Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 0.2 mM pH 7.2, RNasa 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se incuba 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al concluir la incubación con RNasa, se guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta utilizarse.

Cuando los plásmidos se van a secuenciar se purifican con el Kit QIAprep® de Qiagen. En este kit se utilizan columnas que contienen una membrana con gel de sílice para una adsorción selectiva de DNA plasmídico en amortiguadores con una alta concentración de sales y la elución del DNA en amortiguadores con una baja concentración de sales.

## **2.2. DNA genómico**

De un cultivo axénico de *T. cruzi* se colectan  $5 \times 10^6$  parásitos por centrifugación en una microcentrífuga a 500 g y se obtiene su DNA con el kit Genomicprep™ de GE Healthcare. Para purificar el DNA con este kit se rompen las células con un detergente aniónico que hace solubles los componentes celulares. Se agrega un

preservador de DNA que limita la actividad de las DNAsas. Se agregan RNAsas, y se precipitan las proteínas con sales. Finalmente se aísla el DNA mediante precipitación con alcohol.

### 3. *Obtención de RNA*

Se extrajo RNA total de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi* utilizando el reactivo *TRIzol*<sup>®</sup> *Total RNA Isolation Reagent* de Invitrogen. Este reactivo se utiliza para aislar RNA total de células y tejidos. El reactivo es una solución monofásica de fenol e isocitrato de guanidina; es un método mejorado del método de aislamiento de RNA de Chomczynski [53]. Durante la homogeneización de la muestra el Trizol® mantiene la integridad del RNA mientras deshace las células y disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo seguido de centrifugación en una microcentrífuga, separa la solución en una fase acuosa y una fase orgánica. El RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa. Después de transferir la fase acuosa a un tubo nuevo, el RNA se recupera mediante precipitación con isopropilo alcohol. El RNA se obtuvo según las instrucciones del fabricante.

### 4. *Amplificación mediante PCR*

Las reacciones de amplificación se pusieron en una termocicladora con tapa térmica (Eppendorf Mastercycler personal) que posee tapa térmica. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la siguiente tabla.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>Amplificación de la sonda</i>	
1183-1	GGAATTCC CCT TTT CGT GGT ATT CCT
1183-2	GGAATTCC TTC AGT TCA TGT CCC CGA GT
<i>Amplificación del locus</i>	
JM2	TGC TAT CGA GGG GAC AAG GG

JM3	GCA GCG GTG AAT TTT CCC CG
JM4	TGG TGC TTT AGC AGC TCC GG
JM5	TCG TCT GCG TTG TCT CTG GG
<i>Amplificación de la region reguladora</i>	
pGEX Actina 8 forward	<b>GGATCC</b> <b>CC</b> ATG CAG CAT TCT GTT GTT GTG
pGEX actina 8 reverse	<b>GAATTC</b> CTA CGC CCG TAA ATG CAC GG

**Tabla 3.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Sitio de corte de *EcoR I* *BamH I*. En **negritas** nucleótidos agragados para mantener el marco de lectura.

Las reacciones, condiciones de temperatura y tiempo de cada ciclo son los siguientes

#### 4.1. Amplificación de la sonda homóloga

La enzima utilizada fue una mezcla de Platinum<sup>®</sup> Pfx DNA polimerasa y Taq polimerasa en relación 1:5. Se puso Pfx porque corrige los errores de replicación pero quita las colas de poli A, la Taq polimerasa pone las colas de poli A, que se requieren en el siguiente paso.

Reacción		Condiciones de la termocicladora
	Concentración	
Agua bidestilada estéril		Desnaturalización inicial 94°C 2 minutos
Buffer de reacción de la Taq DNA polimerasa	1X	30 ciclos { Desnaturalización 94°C 30 segundos Alineamiento 55°C 30 segundos Extensión 72°C 30 segundos
Cloruro de Magnesio 50mM	1.5 mM	
DNTP's	10 µM	
Oligonucleótido 1183-1	1 µM	Extensión final 72°C 5 minutos
Oligonucleótido 1183-2	1 µM	Se mantiene a 4°C
Polimerasa relación 1:5 Pfx: Taq recombinante (Invitrogen)	0.4 u:1.6 u	
DNA genómico de <i>T. cruzi</i>	100 ng	

**Tabla 4** Condiciones de amplificación de la sonda homóloga

#### 4.2. Amplificación del locus de las isoformas

Para esta amplificación se hizo PCR anidado, se utilizaron los oligonucleótidos JM2 y JM5 en la primera reacción y en la segunda JM3 y JM4. Las condiciones de ambas reacciones fueron iguales.

Reacción		Condiciones de la termocicladora
	Concentración	
Agua bidestilada estéril		Desnaturalización inicial 95°C 2 minutos
Buffer de reacción de la Taq DNA polimerasa	1X	30 ciclos { Desnaturalización 95°C 30 segundos Alineamiento 60°C 40 segundos Extensión 70°C 3 minutos
Cloruro de Magnesio 50mM	1.5 mM	
DNTP's	15 µM	
Oligonucleótido 1183-1	1 µM	Extensión final 70°C 10 minutos
Oligonucleótido 1183-2	1 µM	Se mantiene a 4°C
Taq Polimerasa recombinante (Invitrogen)	2 u	
DNA genómico de <i>T. cruzi</i>	100 ng	

Tabla 5 Condiciones de amplificación del locus de las isoformas.

#### 4.3. Amplificación de la región codificadora del Alelo

Reacción		Condiciones de la termocicladora
	Concentración	
Agua bidestilada estéril		Desnaturalización inicial 95°C 2 minutos
Buffer de reacción de la Taq DNA polimerasa	1X	30 ciclos { Desnaturalización 95°C 30 segundos Alineamiento 68°C 30 segundos Extensión 72°C 1.5 minutos
Cloruro de magnesio 50mM	1.5 mM	
DNTP's	10 µM	
Oligonucleótido 1183-1	1 µM	Extensión final 72°C 10 minutos
Oligonucleótido 1183-2	1 µM	Se mantiene a 4°C
Taq Polimerasa recombinante		

(Invitrogen) DNA genómico de <i>T. cruzi</i>	2 u  100 ng	
---	-------------------	--

**Tabla6.** Condiciones de amplificación de la región codificadora

## 5. Clonación

### 5.1. Vector Zero Blunt® TOPO® de (Invitrogen)

El Vector Zero Blunt® TOPO® es un vector especial para clonar productos romos de PCR, basado en la acción de la topoisomerasa. Esta enzima se une a sitios específicos del DNA y corta el esqueleto de fosfodiéster en una hebra del DNA. La energía de la ruptura se conserva mediante un enlace covalente entre el fosfato 3' de la hebra de DNA y un residuo tirosil de la topoisomerasa. El enlace fosfo-tirosil entre el DNA y la enzima puede ser atacado por el 5' hidroxilo del DNA, religándolo y liberando la topoisomerasa.

Este vector se utilizó para clonar el fragmento de 381 pares de bases que se utilizó como sonda homóloga.

Para clonar en este vector se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante.

### 5.2. pGEM®-T Easy Vector

Este vector es un vector diseñado para clonar con T-A. Al amplificar mediante PCR, algunas polimerasas (como *Taq*) dejan una cola de poli-Adeninas en ambas hebras en la dirección 5' del fragmento, este vector viene lineal con una Timidina terminal en la dirección 3' de ambas hebras. Estas Timidinas en el sitio de inserción incrementan la eficiencia de la ligación de productos de PCR mediante la prevención de la recircularización del vector y proveyendo extremos compatibles para el producto de PCR. Para clonar en pGEM se siguieron las instrucciones del fabricante.

Este vector se utilizó para clonar los loci de los alelos del gen.

### **5.3. *pGEX-3x***

Este vector de expresión se utiliza para producir una proteína fusión con GST (Glutation S Transferasa) en el amino terminal. Es un sistema versátil para la expresión y purificación de proteínas fusión producidas en *E. coli*.

Este vector se utilizó para clonar la región codificadora del gen, empleando los sitios de *Bam*HI y *Eco*RI presentes en el sitio de multiclonación. El oligonucleótido en sentido contiene en sitio de corte de *Bam*HI, 2 nucleótidos para mantener el marco de lectura, el sitio ATG de inicio de la traducción y el inicio del marco de lectura; el reverso tiene el sitio de paro y el sitio de reconocimiento de *Eco*RI. El plásmido fue clonado en *E. coli* cepa JM109 como cepa de mantenimiento y posteriormente se subclonó en *E. coli* BL21 para la expresión de la proteína recombinante.

## **6. *Purificación de fragmentos de un gel de agarosa***

Para purificar fragmentos de DNA, primero se corre la muestra en un gel y una vez que se corrió la muestra se tiñe el gel con Bromuro de Etidio. La banda de interés se identifica con ayuda del marcador de pesos moleculares (Invitrogen trackIt™ 1Kb Plus DNA ladder). Con una navaja se corta el pedazo de gel donde se encuentra el fragmento de interés, se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se purifica el fragmento con el kit *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* de Invitrogen. Este kit está diseñado para purificar fragmentos de DNA de geles de agarosa. Es un procedimiento simple en el que se funde la agarosa con el fragmento de interés y ya en solución se pasa por un cartucho para microcentrífuga basado en sílice. El DNA aislado es puro, no tiene proteínas, ni agarosa.

## **7. *Elaboración de una sonda radiactiva***

Una vez que se tiene el fragmento que se va a marcar radiactivamente, se marca con  $^{32}\text{P}$  utilizando el kit *Random primers labelling system* (Invitrogen) que utiliza el principio de *Random primers* (consiste en una mezcla de hexanucleótidos de cadena sencilla con grupos hidroxilo en sus extremos 5'- y 3'- los cuales se unen a DNA de cadena sencilla, desnaturalizado, y se utiliza como oligonucleótido para que la polimerasa actúe y sintetice el fragmento). Al terminar de marcar el fragmento, se retira la marca radiactiva libre utilizando una columna de sefadex G-50. A una jeringa de 1ml se le quita el émbolo y la aguja, dentro de la jeringa se hace un tapón de fibra de vidrio de aproximadamente 1 cm de espesor. Se agrega sefadex G-50, se coloca la jeringa dentro de un tubo de vidrio corex y se centrifuga la jeringa 2 minutos a 500 g en una súper centrífuga (Sorval, rotor SS34). Se tira el sobrenadante y se repite la operación hasta que el sefadex G-50 llegue a la marca de 1ml. Se coloca debajo de la jeringa (dónde se acopla la aguja) un tubo Eppendorf de 0.5 ml. En la parte superior de la jeringa se agrega el fragmento marcado radiactivamente. Se centrifuga la jeringa durante 10 minutos a 500 g. Se pone la sonda filtrada y sin restos de nucleótidos radiactivos en un tubo Para centrífuga de polipropileno de 50 ml "Corning" y se le agrega 10 ml de TE. Cuando se vaya a utilizar, para hibridar alguna membrana, se hierve durante 10 minutos y se pone 5 minutos en hielo.

## **8. *Southern blot***

Se digieren 5  $\mu\text{g}$  de DNA genómico con enzimas de restricción, se corren en un gel de agarosa al 0.8% a 80 voltios por 4 horas. Se tiñe el gel con Bromuro de Etidio, se fotografía con una regla para posteriormente poder estimar los pesos moleculares. Se pone el gel 15 minutos en solución depurinizante (HCl 0.2 N). Posteriormente se trata

con solución desnaturizadora para Southern (150 mM NaCl y 0.5 N NaOH) durante 30 minutos y finalmente se pone 30 minutos en solución neutralizadora pH7 (NaCl 150 mM y Tris-HCl pH7). Posteriormente el DNA se transfiere mediante capilaridad de 20xSSC a una membrana de nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N de Amersham). El DNA se fija a la membrana mediante luz UV (UV Crosslinker Hoefer Scientific Instruments). La membrana se prehibrida 2 horas a 42°C con solución de prehibridación (55% formamida, 4.5% Denhardt's, 0.2% SDS, 0.1M Buffer de fosfatos, 2.22X SSC, EDTA 0.01 M, en Agua esteril). Se hibrida la membrana con la sonda radiactiva durante 14 horas a 42°C. Se lava la membrana durante 45 minutos, 3 veces, con solución de lavado de membranas (0.2% SDS y 0.2X SSC). Al terminar los lavados la membrana se pone a exponer en una pantalla de fosforescencia Fuji durante 18 horas. Se captura la imagen en un Molecular FX imager (Bio-Rad).

### **9. Northern blot**

En un gel desnaturizante de agarosa al 1% elaborado con MOPS 1x (0.5M MOPS, EDTA 0.01M pH7) y formaldehído 6% se corren 10 µg RNA de epimastigotes, tripomastes y amastigotes de *T. cruzi*, CL Brenner y Pesos Moleculares 0.5-10 Kb RNA ladder de Invitrogen. Al terminar de correr las muestras se corta la fracción del gel que corresponde a los Pesos Moleculares y se tiñe con Bromuro de Etidio, el resto del gel se transfiere por capilaridad de 10XSSC a una membrana de nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N de Amersham), se fija el RNA con rayos UV (UV Crosslinker Hoefer Scientific Instruments). De este paso en adelante el procedimiento es el mismo que en el Southern blot.



## ***10. Expresión de la proteína***

Se pone un cultivo de 3ml en medio LB con ampicilina (100µg/ml), al día siguiente se hace una dilución 1:50 de este cultivo y se deja crecer hasta que tenga una densidad óptica ( $_{600}DO$ ) entre 0.4 y 0.6. Se toma una alícuota de 1ml y se agrega IPTG 1mM, se deja 5 horas incubándose a 37°C con agitación. Se toma una muestra de 1 ml cada hora.

## ***11. Estandarización de la purificación de la proteína***

Un cultivo inducido de 50ml se centrifuga durante 30 minutos a 5,500 g en una centrífuga de mesa (Beckman, Allegra 21 R centrifuge), se resuspende en buffer STE (10 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA), se agrega lisozima a una concentración final de 100 µg/ml y se incuba 15 minutos en hielo para que la lisozima actúe (daña pared celular de bacterias).

### ***11.1. Pruebas de solubilidad***

Se probaron dos detergentes: uno no iónico, Triton X-100, a una concentración del 1% final y uno iónico, Sodio-Lauril Sarcosinato (sarkosyl) a concentraciones finales entre 0.5% y 1.5%. El Tritón x-100 licua tanto la pared como la membrana celular y el sarkosyl solo hace soluble la membrana celular [54].

De la suspensión anterior se ponen 5 ml en 4 tubos Para centrífuga de polipropileno de 10 ml “Corning” con detergente y se incuban 1 hora 30 minutos en movimiento a 4°C, se sonicán 2 veces 10 segundos a 30% de amplitud, se separa la fase soluble y la insoluble mediante centrifugación durante 30 minutos a 5,000 g. Se toman muestras de 5 µl de la fase soluble de cada tubo, se transfiere el sobrenadante, se resuspende la pastilla en buffer de carga para proteínas (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 10% glicerol, 0.01% azul de bromofenol y 0.1% β-mercaptoetanol) y se guarda una alícuota de la fase insoluble de cada tubo.

### **11.2. Secuestro del sarkosyl de la muestra**

Se sabe que la presencia del detergente sarkosyl disminuye la afinidad del GST con el glutatión inmovilizado en una matriz de sefarosa. Se agrega Tritón x-100 [4%] que secuestra el sarkosyl y se incuba 30 minutos a 4°C con agitación. Se centrifuga 30 minutos a 500 g para recuperar la fase soluble.

### **11.3. Unión a sefarosa**

Para unir la proteína a la matriz de sefarosa se utilizó el método en lote. Se puso 1 ml de Glutation Sefarosa<sup>TM</sup> High Performance (GE Healthcare) en un tubo para centrífuga de polipropileno de 50 ml “Corning”, se le agregó un volumen igual de PBS, se lavó con agitación 5 minutos seguido de centrifugación a 1,000 g durante 5 minutos. Se repitió 3 veces el lavado.

Se agrega la fase soluble a la matriz de sefarosa y se dejan uniéndose con agitación en una mecedora (Biorad compact rocker) a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifuga a 500 g durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante, se lava la sefarosa con PBS-Tritón X-100 [1%] durante 5 minutos, se centrifuga 5 minutos a 500 g durante 5 minutos, se repite 3 veces el procedimiento, y luego se lava otras 3 veces únicamente con PBS.

### **11.4. Recuperar la proteína de interés**

En un gel preparativo desnaturizante de poliacrilamida al 10% se separan las proteínas unidas a la matriz. Se tiñe el gel con azul brillante de Coomassie y se destiñe. Con una navaja se corta una banda muy abundante, de 68.67 kDa correspondiente a nuestra proteína de interés. Esta tira se pone en una bolsa, pre-humedecida, para diálisis (Spectra/por cutoff 6,000-8,000 vol/cm 1.7ml) de aproximadamente 12 cm de longitud y se le agrega 6 ml de buffer Tris-glicina 1X. Se pone la bolsa en una cámara de electroforesis horizontal y se agrega el mismo buffer que se depositó dentro de la bolsa

y se lleva a cabo la electroelución durante 5 horas a 20mA. Se colecta el buffer de la bolsa de diálisis, donde está la proteína eluída y se pone en otra bolsa de diálisis, se deja dializando toda la noche contra 10 mM tris pH8, 100 mM NaCl, 10% glicerol. Al día siguiente se concentra utilizando con un cartucho de ultrafiltración de 30 kDa (Amicon®). De la proteína recuperada se corrió una muestra en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 10% y se calculó su concentración mediante estándares de BSA y por densitometría en el Molecular FX imager (Bio-Rad).

### ***12. Obtención de Anticuerpos policlonales contra AcL-4 recombinante***

Para producir anticuerpos se utilizó un conejo Nueva Zelanda hembra que pesó 1.5kg al ingresar al bioterio. El protocolo utilizado fue aprobado por la comisión de bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Después de un periodo de cuarentena de dos semanas, se obtuvo suero preinmune y dos semanas después se inició el proceso de inmunización descrito en la tabla que se muestra a continuación.

		<b>Conejo "L"</b>
<b>Martes 06-05-2008</b>	<i>Llegada y sometido a cuarentena</i>	
<b>Martes 20-05-2008</b>	<i>Obtención de suero Pre-inmune</i>	6 ml
<b>Jueves 5-06-2008</b>	<i>1ª inmunización</i>	450µg en 900 µl
<b>Jueves 31-07-2008</b>	<i>2ª inmunización</i>	230µg en 500µl
<b>Jueves 25-09-2008</b>	<i>3ª inmunización</i>	230µg en 500µl
<b>Jueves 9-10-2008</b>	<i>Sangrado en blanco</i>	

*Tabla7. Protocolo de inmunización del conejo*

En la primera inmunización se puso un volumen igual de adyuvante completo de Freund's (CFA, Sigma) y en las posteriores se utilizó adyuvante de Freund's incompleto

(IFA, Sigma). Dos semanas después de la última inmunización se obtuvo el suero policlonal mediante sangrado en blanco del conejo.

La sangre obtenida se dejó coagular de un día para otro a 4°C y posteriormente se centrifuga durante 30 minutos a 5,000 g en una centrífuga de mesa, para obtener el suero. Este se alicuota en tubos Eppendorf de 2ml y se almacena a -70°C.

### **13. Western blot**

Para saber si el suero policlonal producido por el conejo reconoce específicamente la proteína de estudio, se hicieron estudios de inmunoquímica contra proteínas recombinantes y contra extractos proteicos totales de *T. cruzi*.

Para obtener los extractos proteicos totales, se cosecharon epimastigotes en cultivo mediante centrifugación en una microcentrífuga a 500 g. Los parásitos fueron resuspendidos en buffer de carga de proteínas. En cada carril se ponen aproximadamente  $2 \times 10^6$  parásitos.

La metodología para hacer ensayos de inmunoquímica es básicamente la misma, lo único que varía son los anticuerpos, su concentración y la solución bloqueadora.

El procedimiento es el siguiente: se corren las muestras en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 10% a 20 mA durante 2 horas, se transfiere en buffer de Tris-glicina a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) durante 1 hora a 250 mA a 4°C. Se incubó la membrana toda la noche en la solución de bloqueo a 4°C. Al día siguiente se incubó la membrana con el anticuerpo policlonal contra la proteína recombinante, se efectuaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con 0.25% de Tween20 (v/v) en PBS, se incubó con el anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa, se repitieron los lavados. Finalmente la membrana se trata con reactivo quimioluminiscente Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)

durante 5 minutos en agitación, se expone a placas autorradiográficas (Amersham Pharmacia), y se revela manualmente.

	<b>Proteínas recombinantes</b>	<b>Extractos protéicos totales de <i>T. cruzi</i></b>
Solución de bloqueo	NGS 5% en PBS	Leche descremada en polvo (Svelty) al 5% en PBS
Suero policlonal de conejo contra GST-Actina	dilución 1:2,500,000	dilución 1:8,000
Anicuerpo secundario	Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con HRP (Pierce). 1: 50,000	Anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con HRP (Pierce). 1: 50,000

**Tabla 8** Condiciones de los estudios de inmunoquímica.

#### **14. Dot blot**

De un cultivo de epimastigotes en fase logarítmica se colectan los parásitos mediante centrifugación a 500 g durante 10 minutos. Se lavan 2 veces con PBS. Se resuspenden en PBS con inhibidores de proteasas. Para fijar los parásitos en papel de nitrocelulosa se utiliza un mani-fold Bio-dot. Y se fijan los parásitos con vacío. Se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook [52].

Una vez que se fijan los parásitos a la membrana, se continúa como si se tratara de una membrana de Western blot.

#### **15. Adsorción del suero con GST**

Como explicado anteriormente, se induce la proteína, se solubiliza y se une a GST-sefarosa. Una vez que se tiene la GST unida a la sefarosa, se toman 1/3 de la muestra y se guarda a 4°C, al resto de la sefarosa-GST se le añade el suero a adsorber a una dilución 1:10 en PBS estéril, se deja incubando ON a 4°C en una mecedora, al día siguiente se recupera el suero mediante centrifugación durante 10 minutos a 1000 g en una centrífuga de mesa, se agrega el suero a la GST-sefarosa guardada anteriormente, se incuba 2 horas a 4°C con agitación, y se vuelve a recuperar el suero. El suero

recuperado se esteriliza por filtración con un filtro de jeringa minisart (Sartorius), se alicuota y se congela.

## **16. Análisis bioinformáticos**

### **16.1. Búsqueda de secuencias**

Para buscar las secuencias de los Alelos de Al-4 de *T. cruzi* se hizo un BLAST [55, 56] (Basic Local Alignment Search Tool) en el sitio [www.genedb.org](http://www.genedb.org). En este sitio se seleccionó la base de datos *T. cruzi*. Para realizar la búsqueda se utilizó como templatado la secuencia de la clona Tens1183.

### **16.2. Alineación de secuencias**

#### **16.2.1. DNA**

En la página de Internet del Instituto Europeo de Bioinformática (European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/>) Se utilizaron las herramientas para alinear secuencias de nucleótidos.

#### **16.2.2. Proteínas**

Para alinear la secuencia de aminoácidos del gene de Actina de *T. cruzi* (NCBI gi|3315089|gb|AAP97326.1) con la secuencia del gene Actin like-4 de *T. cruzi* (NCBI gi:98392396| protein ID ABF58722.1) se utilizó el programa LALIGN ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html))

### **16.3. Modelaje tridimensional**

Utilizando el programa Phyre (Protein Homology/analogy Recognition Engine) con la dirección de internet <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/index.cgi> se obtuvieron modelos tridimensionales de la proteína Actin Like 4 y Actina en formato PDB (Protein Data Base). Para visualizar y comparar estos modelos se utilizó

## Resultados

### *Obtención de la sonda homóloga*

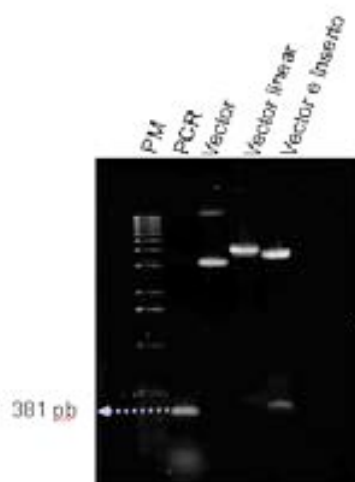
Para identificar secuencias que codifiquen para Actinas presentes en *T. cruzi* se hizo una búsqueda en la base de datos de nucleótidos de GeneBank. Se identificaron dos tipos de secuencias: aquellas correspondientes a una actina convencional, ortóloga a la reportada en *T. brucei* y *Leishmania major*, que ya ha sido caracterizada en el laboratorio; y las que corresponden a una actina diferente. Las clonas que corresponden a una actina diferente son: Tens 1183 (de 546 nucleótidos, GenBank Acc: AA926561) y Tenu 3984 (de 392 nucleótidos, GenBank Acc: AI110312), esta última está etiquetada como “actina similar a la actina de *Chlamydomonas reinhardtii*”. Ya que ambas clonas corresponden a secuencias de cDNA de una base de datos de EST’s (Expressed Sequence Tags) se presumió correspondían a un gene funcional. Para caracterizar su contexto genómico y su expresión a nivel de mRNA, se decidió obtener una sonda homóloga. Para ello a partir de la clona Tens1183 (Figura 10) se diseñaron oligonucleótidos para amplificar mediante PCR, a partir de DNA genómico, un fragmento de 381 pb localizado dentro de la región codificadora. Este fragmento se clonó en el vector TOPO (figura 11) y se secuenció.

```

GGGGGNGNTGCCAGGCTTGCNNTTCGGTACAAGGNTCTCTCTCTCCCTGTTTTTTTTNACATACNACANACTCTTTTCTTCGCTGAGTTTCAT
TGTGTGTTTCCTCAGCCTCTCTTGTGCTCTACGCCCGTAAATGCACGGCGGCGGCCTCCCTTTTCGTGGTATTCCCTCCGAGCAANACACAAGTGC
GAAAACGTTGGCATCGATGCCACAACCGAAGCACCAGATCCAGGTGGCCAGGTCGCGATCTGGAAAAGCAACGCAATTGATCGTTTGTTCCTCCAC
CGTTATTCCGCGCCGACACTTCTCGCTGCAGCCGCTGCTCGATACCGGGGAGCATCGTGTTCCTCCGCGCCGAGCACAATGCTCTCCCATAGCG
CGGTTGTGCGTACAATGGTGCCCGCGCAGACTTGTGTACGGCCTCCGCCACCCCACTTCTCCGTCCCGGCGACCGAAAACCGGCGTCTGTC
GCCCTCGAAGGGTTNAAAAGCACTCGGGGACATGAACTGAACTCTCGTGAANAAAAATGCCTGCTCATCGGGCAATC

```

**Figura 10.** Secuencia Tens1183, correspondiente al extremo 3' del transcrito. En verde el oligonucleótido *Tens1183-1*, en azul el oligonucleótido *Tens1183-2*. La polaridad de la secuencia es la inversa complementaria a la secuencia del gen. Marco de lectura -3. **Región codificadora**. El resto de la secuencia corresponde a la región 3' no traducida.



**Figura 11 Sonda homóloga.** Se muestran en un gel el producto amplificado, el Vector TOPO, el Vector TOPO linear y el vector TOPO con el inserto clonado y liberado.

### *Caracterización de la situación genómica*

Con la secuencia del fragmento amplificado se hizo un BLAST en la base de datos de *T. cruzi* de geneDB y se encontraron las siguientes secuencias de genes con un alto parecido al fragmento amplificado:

[Tc00.1047053510719.110](#) |||actin-like protein, putative|Trypanosoma cruzi|chr unknown59|TIGR||Auto

[Tc00.1047053509747.70](#) |||actin-like protein, putative|Trypanosoma cruzi|chr unknown57|TIGR||Auto

Las dos secuencias encontradas constan de un marco de lectura abierto de 1,146 pb y están anotadas como pertenecientes a una familia de proteínas parecidas a actina (Actin-like proteins) por lo que se alinearon para ver si se parecían entre ellas (Figura 12). Al alinearse se vio que son muy parecidas, pues poseen el 98.2% de identidad y codifican para proteínas con un 97.9% de identidad. Ambos genes están anotados como “Actin like Protein 4”. La secuencia de nuestra sonda corresponde al gene Tc00.1047053510719.110 mientras que las 2 clonas de EST previamente identificadas corresponden al gene Tc00.1047053509747.70.



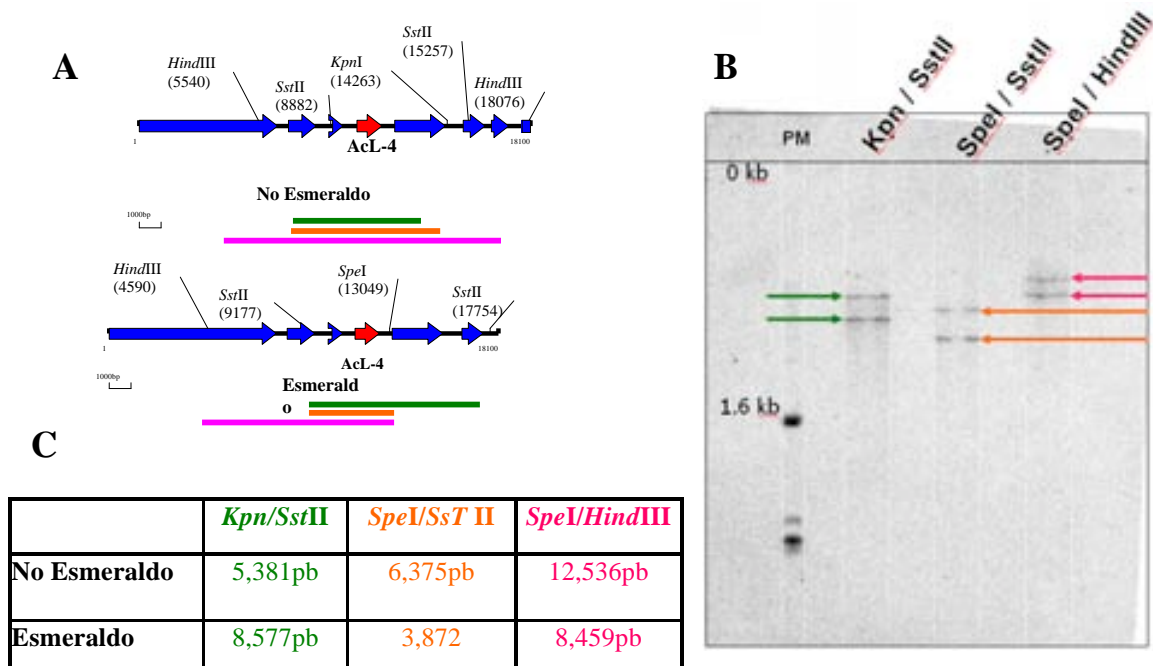
1	1	ATGCAGCATTCTGTGTTGTGGTGGATGTGGGATCGAGCACTACCAGGCT	50
2	1	ATGCAGCATTCTGTGTTGTGGTGGATGTGGGATCGAGCACTACCAGGCT	50
1	51	TGGCTTTGGTGGCGAGGAGGCCACCACGCGTGGTGGCTCCAACCTGTCGTAG	100
2	51	TGGCTTTGGTGGCGAGGAGGCCACCACGCGTGGTGGCTCCAACCTGTCGTAG	100
1	101	GCACACCGTATAATAGCGGCATGCTCGGGTCTCTGTTGCAGCATCACGGT	150
2	101	GCACACCGTATAATAGCGGCATGCTCGGGTCTCTGTTGCAGCATCACGGT	150
1	151	GACACTTTTCCGGGGATGCCGCGTGGGAGCGGCGCGGACTTTTGGAACT	200
2	151	GACACTTTTCCGGGGATGCCGCGTGGGAGCGGCGCGGACTTTTGGAACT	200
1	201	CAGTTACCCCGTCCAGAGTCGTGCTGTGGTCAGCTACAAGGCCCTTGAGC	250
2	201	CAGTTACCCCGTCCAGAGTCGTGCTGTGGTCAGCTACAAGGCCCTTGAGC	250
1	251	ACATCCTACACGATGCATTGTATAAATGGCTTCCTCTGTTCCACATGAC	300
2	251	ACATCCTACACGATGCATTGTATAAATGGCTTCCTCTGTTCCACATGAC	300
1	301	ACACCGCTGCTCTGGGTGGAAACCCGTCACACCCACGTCGAGGACCGTGA	350
2	301	ACACCGCTGCTCTGGGTGGAAACCCGTCACACTTCACGTCGAGGACCGTGA	350
1	351	ACGCATCTGTGAAATTTTTTTGAAAGTTTTGACGTTCCACTGCTTGCCA	400
2	351	ACGCATCTGTGAAATTTTTTTGAAAGTTTTGACGTTCCACTGCTTGCCA	400
1	401	TGACGAATGCTGCGGCAGCGACGTTGTAAGTCCACGGTTCGACGACGGT	450
2	401	TGACGAATGCTGCGGCAGCGACGTTGTAAGTCCACGGTTCGACGACGGT	450
1	451	CTCGTGGTGGACAGCGGTGAGGACTGCACACAGTAAAGCCCGTCTGGGA	500
2	451	CTCGTGGTGGACAGCGGTGAGGACTGCACACAGTAAAGCCCGTCTGGGA	500
1	501	GGGTTACAGCCTGCATCACACTTTCTATTCTCACCCATAGCTGGACGTG	550
2	501	GGGTTACAGCCTGCATCACACTTTCTATTCTCACCCATAGCTGGACGTG	550
1	551	TCTTGACGGATCGTTTACTTGAATATTTGCGGGTAAAGGATACGCCCTC	600
2	551	TCTTGACGGATCGTTTACTTGAATATTTGCGGGTAAAGGATACGCCCTC	600
1	601	TCCACCCACAGGATCGCTGCCTTGTGATAAAAATTAAGCGTTCCCTCTG	650
2	601	TCCACCCACAGGATCGCTGCCTTGTGATAAAAATTAAGCGTTCCCTCTG	650
1	651	CTACGTCGCCCGGATGCCGAAATTGAGTTGAAAAATTTACGCAATAAGC	700
2	651	CTACGTCGCCCGGATGCCGAAATTGAGTTGAAAAATTTACGCAATAAGC	700
1	701	CACGCCCCGATAGCTACGAGTTGCCCGATGAGCAGCGCATTTTTCTTCAC	750
2	701	CACGCCCCGATAGCTACGAGTTGCCCGATGAGCAGCGCATTTTTCTTCAC	750
1	751	GAGAGTCAGTTCATGGTCCCCGAGCTGCTTTTAACCCCTCGAGGGCGAA	800
2	751	GAGAGTCAGTTCATGGTCCCCGAGCTGCTTTTAACCCCTCGAGGGCGAA	800
1	801	CGACGCCGTTTCGGTGCCCGGCAGCAGAGAAGTGGGTGGCGGAGGCCG	850
2	801	CGACGCCGTTTCGGTGCCCGGCAGCAGAGAAGTGGGTGGCGGAGGCCG	850
1	851	TGACACAAGTCGTGCGGCGGGCACCATCGTACGCACAACCGCGCTTATGG	900
2	851	TGACACAAGTCGTGCGGCGGGCACCATCGTACGCACAACCGCGCTTATGG	900
1	901	GAGAGCATTGTGCTCGGCGGCGGAACACGATGCTCCCGGTATCGAGCA	950
2	901	GAGAGCATTGTGCTCGGCGGCGGAACACGATGCTCCCGGTATCGAGCA	950
1	951	GCGGCTGCAGCGAGAAGTGTGCGCGCGGAATAACGGTGGGGAACAACGA	1000
2	951	GCGGCTGCAGCGAGAAGTGTGCGCGCGGAATAACGGTGGGGAACAACGA	1000
1	1001	TCAATTGCGTTGCTTTTCCAGATCGCGACTGGCCACTGGATCGGTGCT	1050
2	1001	TCAATTGCGTTGCTTTTCCAGATCGCGACTGGCCACTGGATCGGTGCT	1050
1	1051	TCCGTTGTGGCATCGATGCCAACGTTTTCGCACTTGTGCTTGTCTCGGGA	1100
2	1051	TCCGTTGTGGCATCGATGCCAACGTTTTCGCACTTGTGCTTGTCTCGGGA	1100
1	1101	GGAATACCACGAAAGGGGGCCGCGCGCTGCATTTACGGGCGTAG	1146
2	1101	GGAATACCACGAAAGGGGGCCGCGCGCTGCATTTACGGGCGTAG	1146

**Figura 12. Secuencias Alineadas :**  
**1: Tc00.1047053509747.70**  
**2: Tc00.1047053510719.110**  
*Identidad:* 1125/1146 (98.2%)  
*Similitud:* 1125/1146 (98.2%)  
*Gaps:* 0/1146 ( 0.0%)

---

---

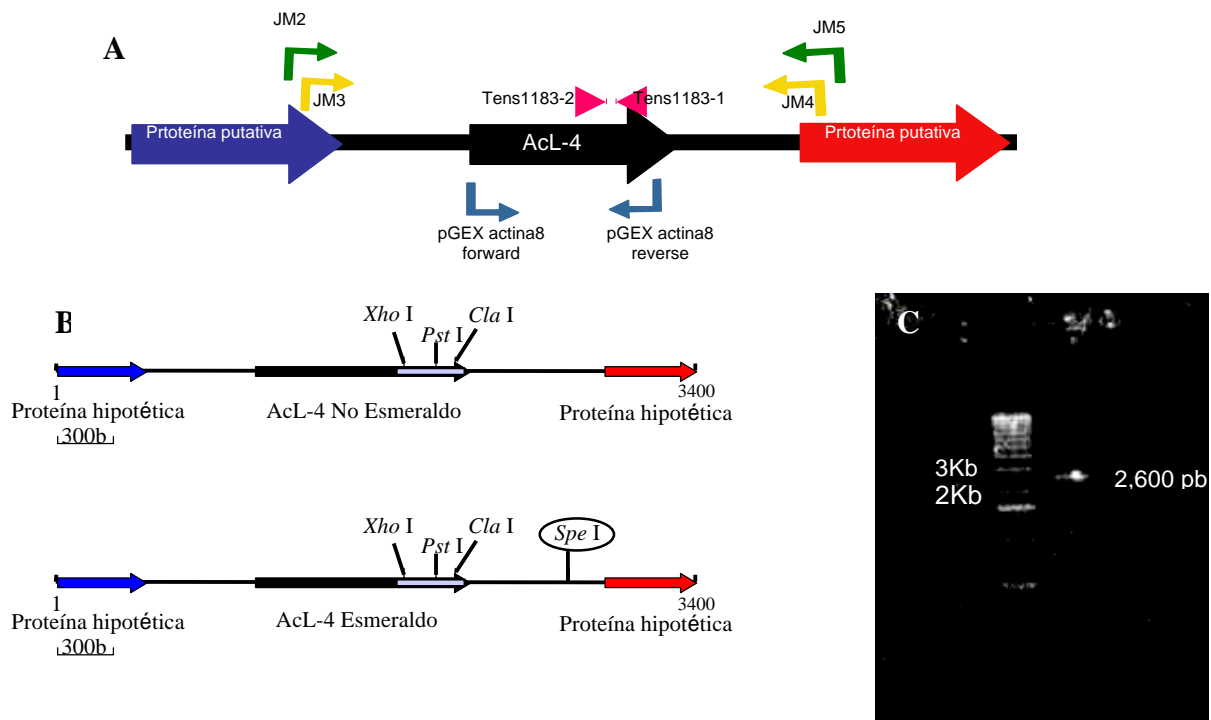
Para caracterizar su contexto genómico, en la página electrónica GeneDB se obtuvieron los contigs en los que se encuentran localizados estos genes. Se alinearon ambas secuencias y se vio que el contexto genómico era el mismo, lo que demuestra que estos genes corresponden a las variantes alélicas de la proteína Actin-like 4 (AcL-4). Ambos contigs contienen el gene de AcL-4 precedido y procedido por los mismos marcos de lectura de proteínas hipotéticas (Figura 13 A). El gene Tc00.1047053510719.110 se localiza en el contig 5979, (compuesto por 67,245 pb) y corresponde al alelo Esmeraldo; y el gene Tc00.1047053509747.70 se localiza en el contig 5777 (compuesto por 28,242 pb) y corresponde al alelo No Esmeraldo. Ya que en nuestra cepa se han detectado diferencias con las secuencias reportadas en el proyecto del genoma, se decidió definir si nuestra cepa contiene diferencias con estas secuencias y para esto se hizo un Southern blot. En el diseño de este experimento se hizo un mapa de restricción del área correspondiente a la región en donde se encuentra codificado AcL-4 (~8kb) y se buscaron enzimas que al cortar el DNA produjeran fragmentos, de tamaños diferenciables, que contuvieran los genes de estudio. Se seleccionaron las siguientes combinaciones de enzimas: *Sst* II y *Kpn* I, *Sst* II y *Spe* I, *Spe* I y *Hind* III (Figura 13B). Una vez identificados los sitios de corte se digirió DNA y se hizo el Southern blot genómico con dichas enzimas. Se confirmó la presencia de dos bandas que hibridan con la sonda homóloga. Los tamaños de estas bandas concuerdan con el mapa génico teórico de las secuencias reportadas (Figura 13).



**Figura 13.** A) mapas del contexto genómico de ambas variantes alélicas de los genes que codifican para AcL-4. Las líneas demuestran los fragmentos resultantes de las digestiones. B) Southern blot en donde se ven las bandas que hibridan con la sonda homóloga. Las líneas de colores indican a qué digestión y alelo corresponde cada banda. Esto se encuentra resumido en la tabla C.

### Clonación del locus

Basándonos en los alineamientos de los contigs que contienen el locus de AcL-4, se diseñaron 4 oligonucleótidos en regiones idénticas de los dos contigs para amplificar, mediante PCR anidado, simultáneamente ambos alelos con sus regiones reguladoras río arriba y río abajo. Los oligonucleótidos se anclan en el gene río arriba y en el gene río abajo (Figura 14A y 14B) lo que amplificaría un fragmento final de 2,585pb. De esta manera se amplificó a partir de DNA genómico un fragmento de aproximadamente 2,600 pb (Figura 14C) el cual fue clonado en el vector pGEM<sup>®</sup> T-easy.

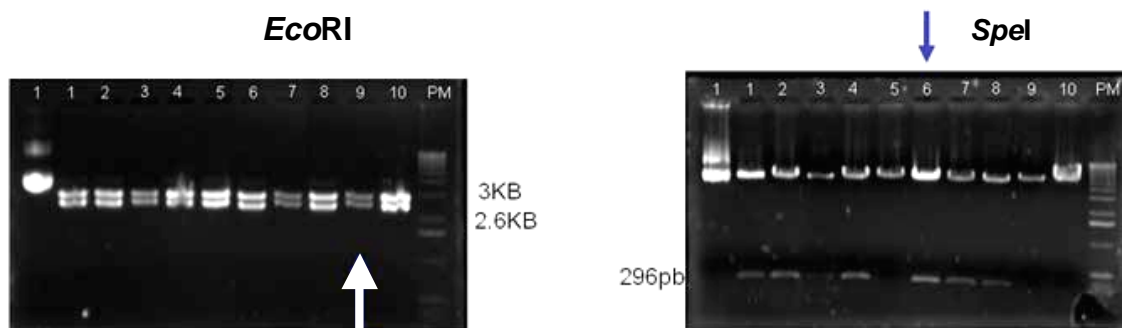


**Figura 14 Protocolo para la clonación de AcL-4 y sus regiones reguladoras.** **A** Se muestra la localización de los oligonucleótidos utilizados. Los oligonucleótidos JM2 y JM5 fueron utilizados en la primera amplificación y los oligonucleótidos JM3 y JM4 fueron utilizados en la segunda amplificación. Se muestra la localización de Tens1183-1 y 2, utilizados para amplificar la sonda. También se indica la posición de los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región codificadora (pGEX Actina 8 forward y reverse) **B** Diagrama representativo del locus de AcL-4 que incluye la región de interés y los marcos de lectura abierta de los genes río arriba y río abajo. Las barras grises dentro del gene corresponden al fragmento que se utilizó como sonda. En un círculo se indica el sitio de restricción *Spe* I, presente en el alelo Esmeraldo y ausente en el No Esmeraldo. **C** El producto de PCR resultante de la segunda amplificación tiene un tamaño de 2,585 pb. Se clonó en el vector pGEM® T-easy.

### Caracterización de las clonas

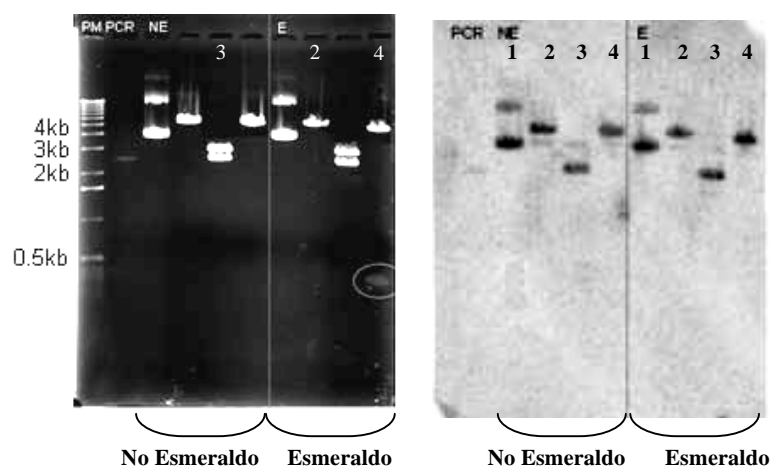
Se seleccionaron diez colonias y se purificaron sus plásmidos. Se digirieron con *Eco*R I para que se liberara el inserto del vector pGEM® T-easy (Figura 15). Las diez clonas tuvieron el inserto del tamaño deseado (~2,600 pb). Aprovechando la presencia de un sitio de restricción de *Spe* I presente solo en el haplotipo Esmeraldo, se mapeó este sitio en las clonas obtenidas para así poder determinar al haplotipo al que pertenecen (Figura 14B). Se esperaba que las clonas correspondientes al alelo Esmeraldo, al ser digeridas con *Spe* I liberaran un fragmento de 296 pb o 2,289 pb, dependiendo de su orientación. De acuerdo con los mapas de

restricción 6 de las de las clonas son consistentes con un haplotipo Esmeraldo y 4 con el No Esmeraldo (Figura 15).



**Figura 15.- Caracterización de las variantes alélicas del gene de AcL-4.** Se seleccionaron 10 colonias, se cultivaron, cosecharon y purificaron sus plásmidos. Los plásmidos se caracterizaron mediante mapeo de restricción con *EcoRI* y *Spe I*. Se seleccionó la colonia 6 como haplotipo Esmeraldo y la 9 como No Esmeraldo (indicados con flechas).

Se seleccionó la clona número 9 como No Esmeraldo y la 6 como Esmeraldo. Para completar su caracterización, primero se demostró que ambas clonas contuvieron el gene AcL-4 mediante la hibridación con la sonda de AcL-4 marcada radiactivamente con  $^{32}\text{P}$  (Figura 16) y posteriormente esto se confirmó por secuenciación.



**Figura 16** Gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio. **Carril 1** PM, **Carril 2** Producto de PCR en donde se amplificaron los dos loci. **1** plásmido **2** plásmido linear **3** plásmido con inserto liberado **4** plásmido digerido con *Spe I*. El fragmento liberado con *Spe I* (en el círculo) no hibrida ya que la sonda no lo reconoce, este fragmento se localiza en la región 3'UTR del gene de AcL-4 (figura 14B)

---

---

Ambas clonas se secuenciaron en su totalidad para determinar si existen diferencias con las secuencias reportadas. El marco de lectura abierto de la clona Esmeraldo presenta dos cambios respecto a la clona reportada. Uno en el nucleótido 349 que corresponde a la primera posición del codón, nuestra cepa tiene **AAA** (lisina) mientras que en el reportada se tiene **GAA** (ácido glutámico); el segundo cambio se presenta en la posición 963 que corresponde a la tercera posición del codón, nuestra cepa tiene **CGG** (arginina) y la reportada **CGA** (arginina). En cambio el de la clona No Esmeraldo presenta un cambio en la posición 996, en nuestra secuencia tenemos una G y la reportada presenta una A. El cambio se localiza en la tercera posición del codón que codifica para glutamina en la posición 296 del péptido y es un cambio conservado, de CAA cambia a CAG. Ambos codones codifican para Glutamina.

### ***Análisis de secuencia***

En el sitio de *T. cruzi* GeneDB, en donde se encuentran reportadas y anotadas las secuencias del genoma de este organismo, es posible obtener la información relevante a cada gene identificado incluyendo datos sobre la proteína para la cual codifica como: su tamaño, punto isoeléctrico teórico y la presencia de motivos conservados que sugieren su identidad y función. En el caso de los genes anotados como actin-like 4 se identificaron dominios presentes en proteínas pertenecientes a la familia de las actinas. Para validar esta anotación se utilizó la secuencia deducida de aminoácidos para hacer una búsqueda de BLASTp [55, 56] la cual incluye la identificación de las proteínas con mayor similitud reportadas en la base de datos de NCBI (tabla 9) y el reconocimiento de motivos conservados, utilizando la base de datos de dominios conservados de NCBI (CDD database) (tabla 10).

En la lista de proteínas similares, al menos las primeras dos mil corresponden a actinas de diversos organismos. La actina de *C. reinhardtii* aparece en la posición 10, mientras que la

actina convencional de *T. cruzi* se identificó en la posición 1,355. AcL-4 posee un 33.9% de identidad y un 54% de similitud (figura 17).

Identificador del gen	Nombre	Organismo	Identidad	Similitud
<a href="#">Tc00.1047053509747.70</a>	Actin-like protein 4	<i>T. cruzi</i>	381/381 (100%)	381/381 (100%)
<a href="#">Tc00.1047053510719.110</a>	Actin-like protein 4	<i>T. cruzi</i>	373/381 (97%)	376/381 (98%)
<a href="#">Tb11.01.1870</a>	Actin-like protein	<i>T. brucei</i> TREU927	228/390 (58%)	283/390 (72%)
<a href="#">emblCBH18017.1</a>	Actin-like protein	<i>T. brucei</i> gambiense DAL972	225/377 (59%)	275/377 (72%)
<a href="#">LbrM35_V2.3540</a>	Actin-like protein	<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	168/386 (43%)	225/386 (58%)
<a href="#">LmjF36.3310</a>	Actin-like protein	<i>L. major</i>	169/395 (42%)	227/395 (57%)
<a href="#">LinJ36.3460</a>	Actin-like protein	<i>L. infantum</i> JPCM5	164/386 (42%)	219/386 (56%)
<a href="#">gblAAC16053.1</a>	actin	<i>Scherffelia dubia</i>	134/367 (36%)	206/367 (56%)
<a href="#">KLTH0G18832g</a>	KLTH0G18832p	<i>L. thermotolerans</i>	132/366 (36%)	211/366 (57%)
<a href="#">5724669_IDA5</a>	Actin	<i>C. reinhardtii</i>	141/378 (37%)	218/378 (57%)

**Tabla 9.** Proteínas con mayor similitud a las variantes alélicas del gene de estudio.

En total se identificaron cinco algoritmos que la catalogan como actina, dos que la catalogan como actina o proteínas similares a actina y tres que lo reconocen como perteneciente a la superfamilia de actina (tabla 10).

Base de Datos	# acceso	Descripción
Conserved domains database (NCBI)	Cd00012♣	Actin
Pfam	Pfam00022* ♣	Actin
Smart	Smart00268 ♣	Actin; ACTIN subfamily of ACTIN/mreB/sugarkinase/Hsp70 superfamily
Conserved Domain NCBI	COG5277 ♣	Actin and related proteins [Cytoskeleton]
NCBI[57]	PTZ00004♣	Actin; Provisional (Leishmania, Apicomplexa)
NCBI[58-60]	PTZ00281♣	Actin; Provisional ( <i>D. discoideum</i> )
NCBI[61]	PTZ00280♣	Actin; Provisional (protista)
Interpro	IPR004000*	Actin/Actin-like
InterPro	IPR001023*	Heat shock protein Hsp70
Prosite	PS1036*	Heat shock hsp70 proteins family signature 3

**Tabla 10.** Resumen de la búsqueda de dominios y motivos conservados en la secuencia de AcL-4  
\*información encontrada en la página de GeneDB. ♣ Información obtenida del Blastp en NCBI.

**CDD** es recurso para la clasificación de dominios de proteínas del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

**Pfam** es una colección de familias proteicas, representadas por múltiples alineamientos de secuencias y Modelos Ocultos de Markov (HMM Hidden Markov Models).

**Smart** está clasificado como un modelo que puede reconocer más de un dominio.

**Interpro.** Es una base de datos de familias de proteínas, dominios, regiones, repeticiones y sitios en los que características identificables en proteínas pueden ser aplicadas a nuevas secuencias de proteínas.

**Prosite.** Consiste en entradas que describen dominios de proteínas, familias y sitios funcionales, así como patrones asociados y perfiles para identificarlos.

CDD programa también identificó la presencia de los sitios de unión a ATP, gelsolina (aunque en el genoma de *T. cruzi* no se encuentra el ortólogo de gelsolina ni ninguna proteína parecida) y profilina. Debido a todas estas similitudes, se decidió alinear la secuencia de AcL-4 con la actina convencional de *T. cruzi* en el programa LALIGN, para ver qué tan parecidas son. Estas secuencias poseen un 33.9% de identidad y un 54% de similitud.

AcL-4 *T. cruzi* 381 aa

Actina *T. cruzi* 376 aa

33.9% de identidad en 378 aa

```

          10          20          30          40          50          60
AcL-4  QHSVVDVVGSSSTRRLGFGGEEAPRVVAPT VVGTPYN-SGMLGSELLQHGGDTFAGDAAWE
      . . . . . : : : . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Actina EQSAIVCDNGSGMVKAGFSGDDAPRHVFP SIVGRPKNEQAMMGSASKK---LFVGDDEAQA
          10          20          30          40          50          60

          70          80          90          100         110         120
AcL-4  RRGLLELSYPVQSRRVASHKALEHILHDALYKWLPLVPHDTPLLWVEPVSTSRREDRERIC
      . : : : : : : : . . . : : : : : : : : . . . : : : : : : : :
Actina KRGVLSLKYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVNPESHVLLTEAPMNPQONREKMT
          70          80          90          100         110         120

          130         140         150         160         170         180
AcL-4  EIFFESFDVPLLAMTNAAAATLYSTGRRTGLVVDSDGECTTVNAVWEGYSLHHTFYSSPI
      . : : : : : : : . . . : : : : : : : : : : . . . : : : : : .
Actina QIMFETFVGPAMYVGIQAVLSLYSSGRTTGIVLDAGDGVTHTPVIYEGYSLPHAIRMDM
          130         140         150         160         170         180

          190         200         210         220         230         240
AcL-4  AGRVLTDRLLLEYLRGKGYALSTPQDRCLVDKIKRFLCYVAADAEIELKNLRNKPRPDSYE
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Actina AGRDLTEYLMKLLMESGMTFTTSAEKEIVRNVKEQLCYVALDFDEEVTNSAKTVNEEPFE
          190         200         210         220         230         240

          250         260         270         280         290         300
AcL-4  LPDEQRIFLHESQFMVPELLEFNPSRANDAGFGAGDREVGWAEAVTQVRRAPSYAQPRLW
      : : : . . . . : : : : : . . . : : : : : : : . . . . . : :
Actina LPDGTIMQVGNQRFRCPALFKPM-----LIGLDEAPGFHEMTFQSINKCDIDVRRDLY
          250         260         270         280         290

          310         320         330         340         350         360
AcL-4  ESIVLGGGNTMLPGIEQRLQREVSARNNGGEQTINCVAFPDRDLAAWIGASVVASMPFTFS
      . : : : : : : . . . : : : . . . . . : : : : : : : : : : : :
Actina GNIVLSSGGTTFMFKNLPERLGKEISNLAPSSIKP-KVVAPPERKYSVWIGGSILSSLTTFQ
          300         310         320         330         340         350

          370
AcL-4  HLCLAREEYHEKGAAAVH
      . . . : : : : : :
Actina TMWIKKSEYDEAGPSIVH
          360         370

```

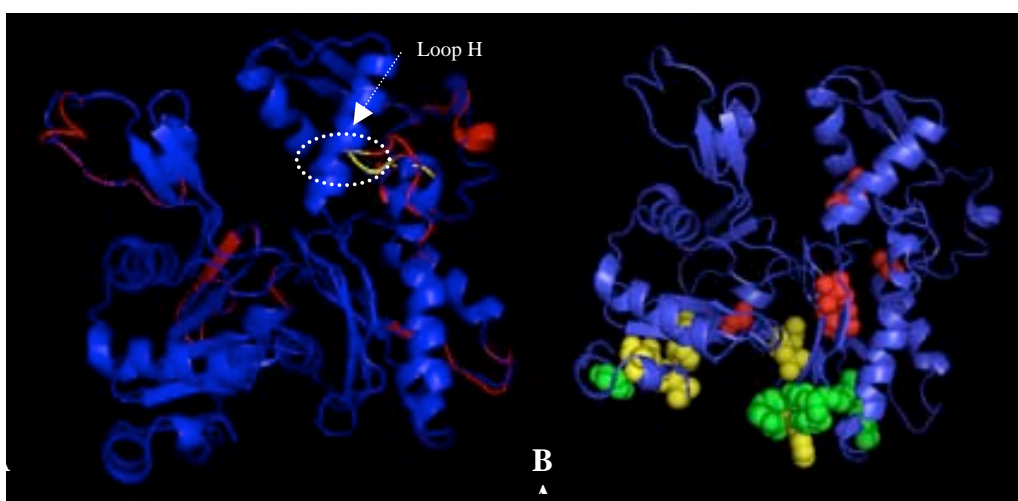
Figura 17. Actina de *T. cruzi* alineada con Actin like-4. **Inserción de 6 aminoácidos.**

• Idénticos, . Conservado.



Debido a que varios algoritmos para identificar motivos y dominios reconocen a AcL-4 como actina y en secuencia el parecido con la actina convencional de *T. cruzi* es bajo, se decidió modelar la estructura de ambas proteínas para determinar si el reconocimiento está dado por la estructura y no por la secuencia. Se utilizó el programa PHYRE [62] que utilizó como referencia para el plegamiento de ambas proteínas a la actina de músculo esquelético de insecto (PDB c1o1aY). AcL-4 se comienza a modelar a partir del aminoácido 12 y llega al 377 (de 381 aa), actina comienza a modelar en el aminoácido 3 y llega al 371 (de 375)

Una vez modeladas se analizaron en el programa Pymol. Aquí se vio que la estructura de ambas proteínas es muy parecida (Figura 18). El modelo de AcL-4 identificó que la inserción identificada de 6 residuos se localiza en la región correspondiente al LoopH (Figura 18A). Esta región es muy importante para la formación y estabilización de microfilamentos ya que es esencial para los contactos laterales entre las hebras del filamento de actina [63, 64]. Anteriormente al hacer el BLAST el mismo programa identificó los sitios de unión de ATP, gelsolina y profilina; al buscarlos en la estructura tridimensional, vimos que se localizan en los lugares esperados (Figura 18B).

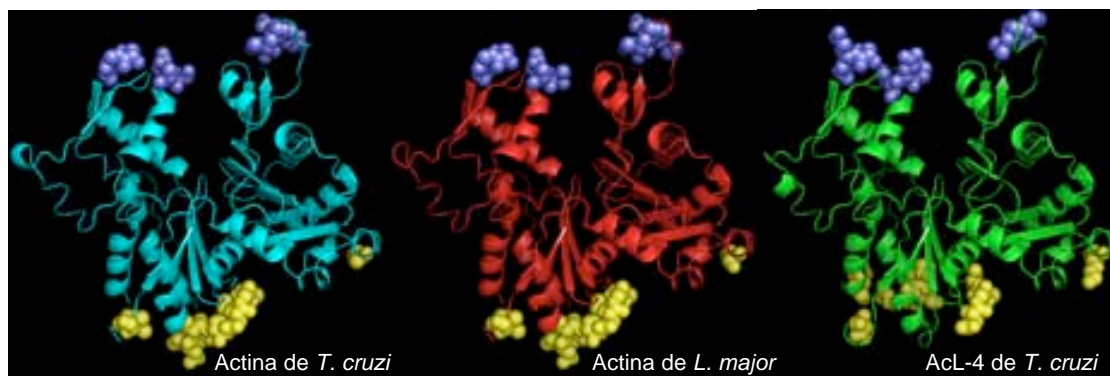


**Figura 18 Modelo estructural de AcL-4 .A** Modelo estructural sobrepuesto de AcL-4 (rojo) y de Actina de *T. cruzi* (azul) en amarillo y resaltado con un círculo vemos la inserción de 6 aa presentes en AcL-4. **B** AcL-4 tiene los sitios de unión a Gelsolina (amarillo), Profilina (verde) y ATP (rojo) conservados y en la localización esperada.

---

---

Al ver que AcL-4 tiene conservados los sitios de unión a Profilina, proteína reguladora de la polimerización de filamentos; y el sitio de unión a ATP que se requiere para que la proteína funcione como ATPasa, que son una clase de enzimas que catalizan la descomposición de ATP a ADP y liberan un ion de fosfato. Esta defosforilación libera la energía suficiente para la unión de un monómero de actina en la polimerización. Con estas evidencias, suponemos que AcL-4 cumple con los requerimientos mínimos para formar filamentos. La única actina de tripanosomátidos de la que se tiene evidencia de su polimerización es la de *L. major* (L16961) [65]; por lo que se compararon los sitios de interacción entre monómeros de actina de *L. major*, con los de AcL-4. Para esto se mandó modelar la estructura de la actina de *L. major*, utilizando los mismos parámetros que se utilizaron para modelar AcL-4. En los modelos de estructura de ambas proteínas se buscaron los sitios de interacción entre monómeros [39] y se compararon las secuencias para ver la similitud de los residuos involucrados (figura 19) (Tabla 11). La actina de *T. cruzi* es la ortóloga de la utilizada de *L. major*, poseen un 88% de identidad y un 95% de similitud. Es pertinente destacar que la actina de conejo (*Oryctolagus cuniculus*, con número de acceso NP\_001095152.1) es la actina que se ha utilizado para realizar estas caracterizaciones. Esta actina y la de *L. major* poseen tan solo un 69% de identidad. Al comparar los sitios de interacción de aminoácidos de la actina “modelo” de conejo con la de *L. major* se ve que poseen un 54% de identidad y un 90% de similitud, asimismo AcL-4 posee un 47% de identidad y un 57% de similitud con la actina de conejo. Llama la atención que una proteína altamente conservada en eucariontes superiores (~90%) tenga una identidad de tan solo 54% en los residuos funcionales involucrados en la formación de filamentos, una de las características prototípicas de las actinas.



Datos obtenidos de "Actin".Sheterline, Clayton

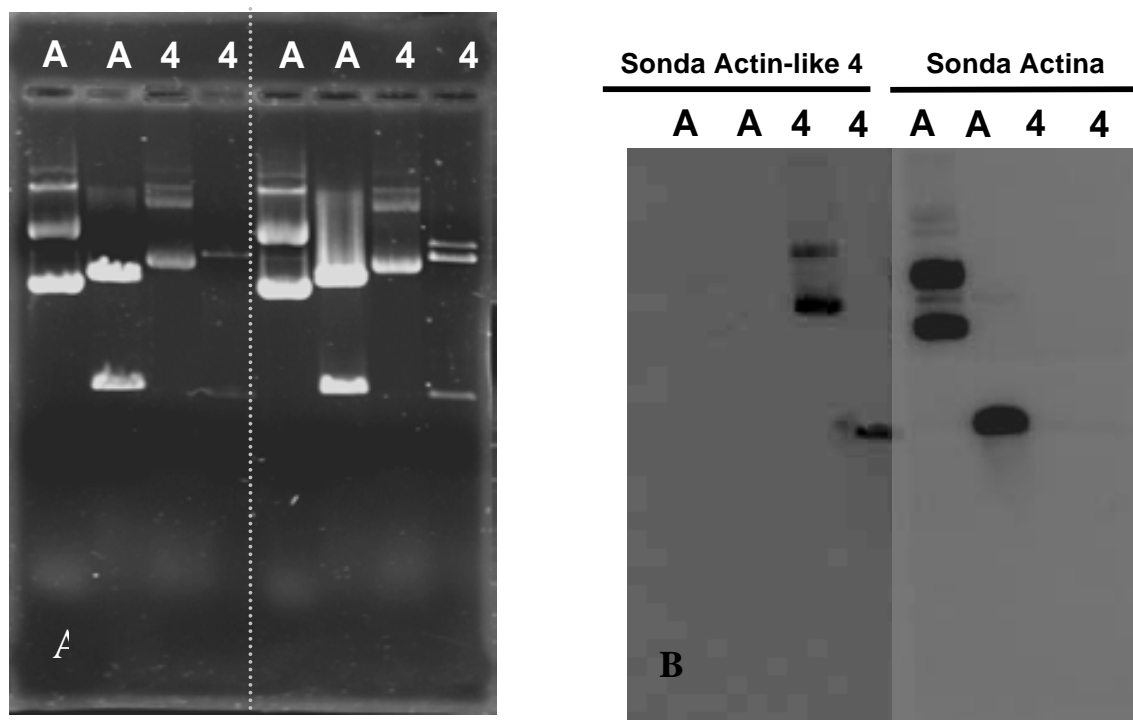
**Figura 19** Comparación entre actina de *T. cruzi*, actina de *L. major* y AcL-4. En la figura se muestra la Posición de los residuos que estabilizan las uniones entre monómeros de Actina. En azul se encuentran los residuos de la parte superior del monómero, que interactúan con los amarillos, que son los de la parte inferior.

	Arriba	Abajo
<b>Actina de <i>L. major</i></b>	41-45, 202-204, 243-245,	166-169, 286-289, 322, 325, 365
<b>AcL-4</b>	38-41, 201-203, 242-244	165-168, 291-294, 325, 327, 371
<b>Identidad</b>	30%	37%
<b>Similitud</b>	56%	62%

**Tabla 11** se muestra la posición de los residuos en AcL-4 y en la actina de *L. major*; también se muestra la identidad y la similitud entre los residuos de la actina de *L. major* y la de AcL-4 La similitud entre los residuos de la actina de *T. cruzi* y la actina de *L. major* es de 95%, y los residuos se encuentran en la misma posición, por lo que la actina de *T. cruzi* no se muestran en la tabla.

### **Especificidad de la sonda de AcL-4**

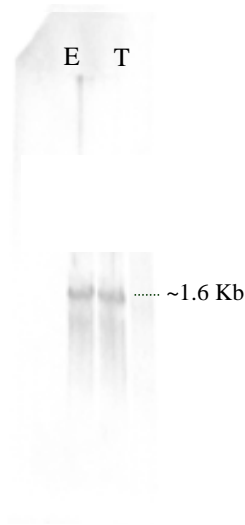
Para confirmar que el fragmento obtenido es específico y no cruza con el gene de actina de *T. cruzi* y por lo tanto puede utilizarse como sonda estudiar AcL-4; se hicieron experimentos para descartar que exista reconocimiento cruzado de la sonda de AcL-4 y la Actina de *T. cruzi*. En un gel de agarosa se corrieron los plásmidos que contienen a Actina y a AcL-4, se hizo un Southern blot con la sonda de actina y con la sonda de AcL-4 (Figura 20). De acuerdo con esta figura, las sondas de estos genes no presentan reconocimiento cruzado, cada una es específica.



**Figura 20** *A* en un gel de agarosa se corrieron los plásmidos que contienen clonados tanto al gene de Actina (*A*) como al de AcL-4 (*4*). En el primer carril está el plásmido TOPO con Actina clonada, el carril 2 TOPO-Actina con el inserto liberado, carril 3 pGEM con Al-4 clonada, carril 4 pGEM- AcL-4 con el inserto liberado. Y se vuelven a repetir en el mismo orden. *B* membrana de nylon con el DNA e hibridada tanto con la sonda de AcL-4 como con la sonda de Actina.

### **Expresión a nivel de mRNA**

Originalmente el gene de estudio se localizó en una biblioteca de expresión de epimastigotes de *T. cruzi*. Para asegurarnos de la presencia de mRNA en nuestra cepa se hizo un Northern blot con RNA extraído de parásitos en los estadios epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*. La presencia de mRNA en amastigotes no pudo determinarse ya que no fue posible obtener cantidades suficientes de RNA de este estadio. En estudios de hibridación de RNA de epimastigotes y tripomastigotes con la sonda de AcL-4 se ve una banda que corresponde a un mRNA de aproximadamente 1.6 kilobases (Figura 21).

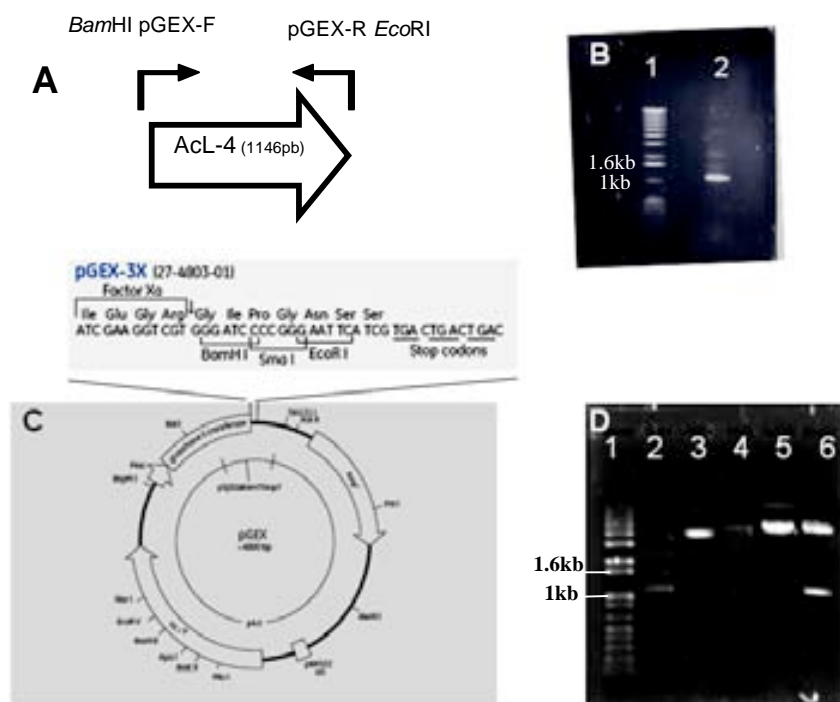


**Figura 21** En el RNA de epimastigotes y tripomastigotes se observa que la sonda radioactiva de AcL-4 hibrida con una banda de aproximadamente 1.6 Kilo bases (E-epimastigotes T-tripomastigotes)

### **Subclonación de lgen eAcL-4**

A partir del plásmido pGEM-AcL-4 No-Esmeraldo, que contiene el gene con sus regiones reguladoras río arriba y río abajo, se diseñaron primers para amplificar únicamente el gene de AcL-4 y subclonarlo en un vector de Expresión (Figura 22). El vector que se utilizó fue pGEX-3x. Este es un vector de expresión que forma una proteína fusión con GST en el amino terminal. Se diseñaron dos oligonucleótidos: *pGEX Actina 8 forward* y *pGEX Actina 8 reverse* para amplificar únicamente la región codificadora del gene (Figura 22). Al oligonucleótido *pGEX Actina 8 forward* se le agregó en el extremo 5' un sitio de reconocimiento para *BamH I* y se agregaron dos citocinas (C), para que la proteína estuviera en fase con GST; en el oligonucleótido *pGEX Actina 8 reverse* en el extremo 3' inmediatamente después del codón de paro se agregó un sitio de reconocimiento para *EcoR I*, esto permite darle polaridad al inserto y subclonarlo en la dirección deseada. Mediante PCR, se amplificó el gen, se clonó en pGEM como vector de mantenimiento, se subclonó en el vector de expresión pGEX-3x y se mandó a secuenciar para confirmar que el marco de lectura

del vector y del inserto estuvieran en fase, una vez confirmado se transformó en *E. coli* cepa BL21.

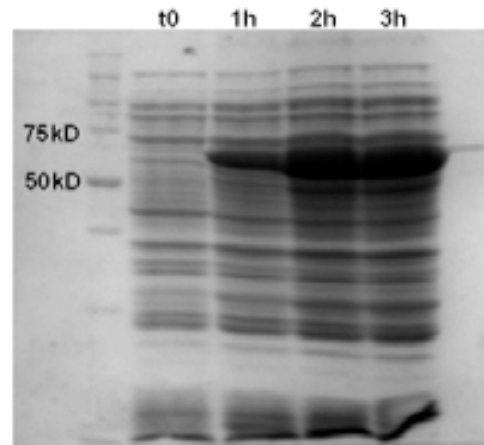


**Figura 22.** A) representación de los oligonucleótidos y del gene de *ACL-4* que se amplificó. B) 1 Marcador de Pesos Moleculares 2Producto de PCR en un gel de agarosa al 8%. C) Esquema del sitio de multiclonación del vector de expresión pGEX-3x. D) Gel de agarosa al 8% en donde se muestra: 1marcador de pesos moleculares, 2 producto de amplificación del gene con los oligonucleótidos pGEX-F y pGEX-R, 3 Vector pGEX superenrollado, 4 Vector pGEX linear, 5 Vector pGEX con el inserto clonado, Vector pGEX con el inserto liberado.

### Expresión de la proteína

Para estandarizar las condiciones óptimas de expresión y su subsecuente purificación se realizaron ensayos de inducción con IPTG 1mM durante 5 horas, tomando muestras de 1ml de cultivo cada hora. Posteriormente se cosecharon las células colectadas y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de buffer de carga para proteínas. Se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida y se vio que al agregar el inductor comienza la expresión de la proteína. Se

decidió inducir únicamente 3 horas, ya que dejarlo más tiempo no parece incrementar la cantidad de proteína (Figura 23).

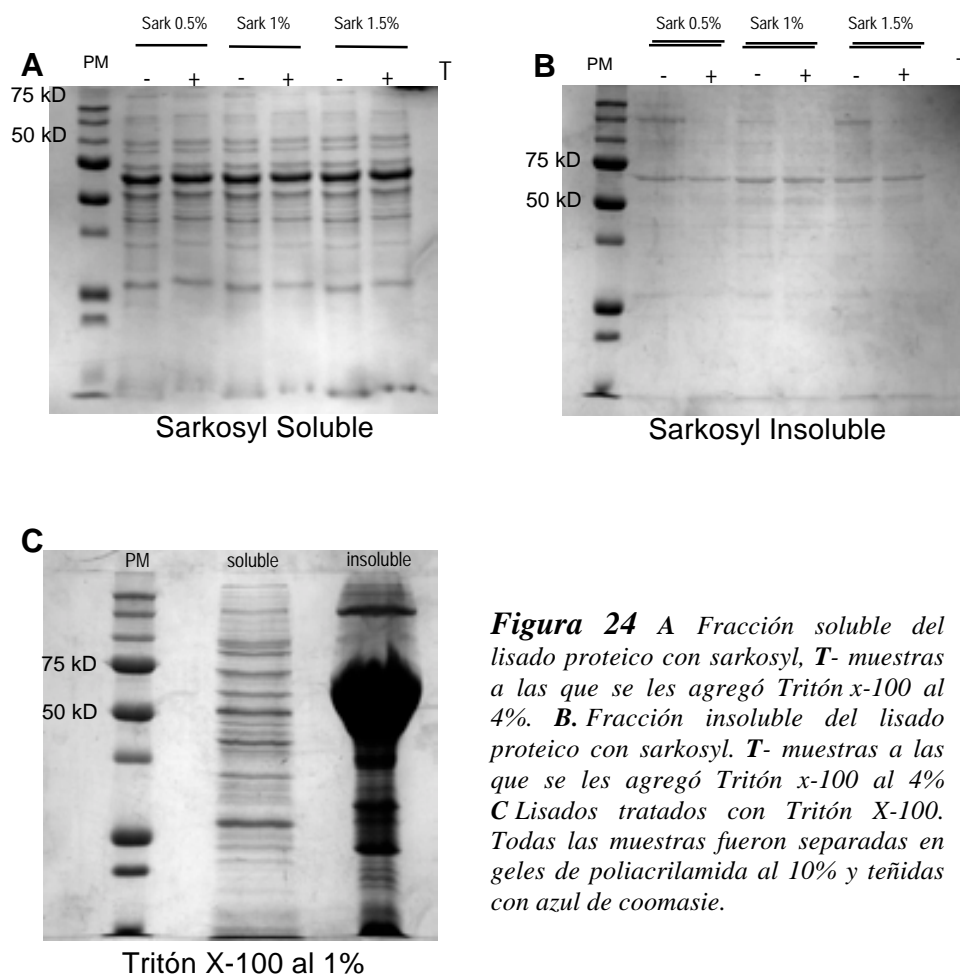


**Figura 23** Proteína recombinante *Gst-AcL-4* inducida con IPTG. La proteína fusión tiene un tamaño de 68.67kDa. Gel de poliacrilamida al 10% teñido como azul de coomassie

#### **Purificación de la proteína**

Las proteínas fusionadas con GST se purifican fácilmente de lisados de bacterias mediante cromatografía de afinidad utilizando Glutación inmovilizado en sefarosa. Para purificar la proteína se debe lisar la célula y hacer soluble la proteína de interés. Se probaron simultáneamente dos detergentes: uno no iónico, Triton X-100, a una concentración del 1% final y uno iónico, Sodio-Lauril Sarcosinato (sarkosyl) a concentraciones finales entre 0.5% y 1.5%. El Tritón x-100 hace soluble tanto la pared como la membrana celular y el sarkosyl solo licua la membrana celular [54]. A las células que se les agregó sarkosyl, la proteína se encontró en la fracción soluble del lisado proteico (figura 24A y 24B) mientras que a las que se les agregó Tritón X-100, la proteína se fue a la fracción insoluble de la muestra (Figura 24C). Se sabe que la presencia del detergente sarkosyl disminuye la afinidad del GST con el glutación inmovilizado en una matriz de sefarosa; debido a esto, se agrega Tritón x-100 [4%] que secuestra al sarkosyl (Figura 24A y 24B). Debido a los resultados observados se decidió

hacer soluble la proteína con Sarkosyl al 0.5%. La adición de Triton X-100 a las muestras tratadas con sarkosyl no modifica la solubilidad de la proteína recombinante presente en estas.



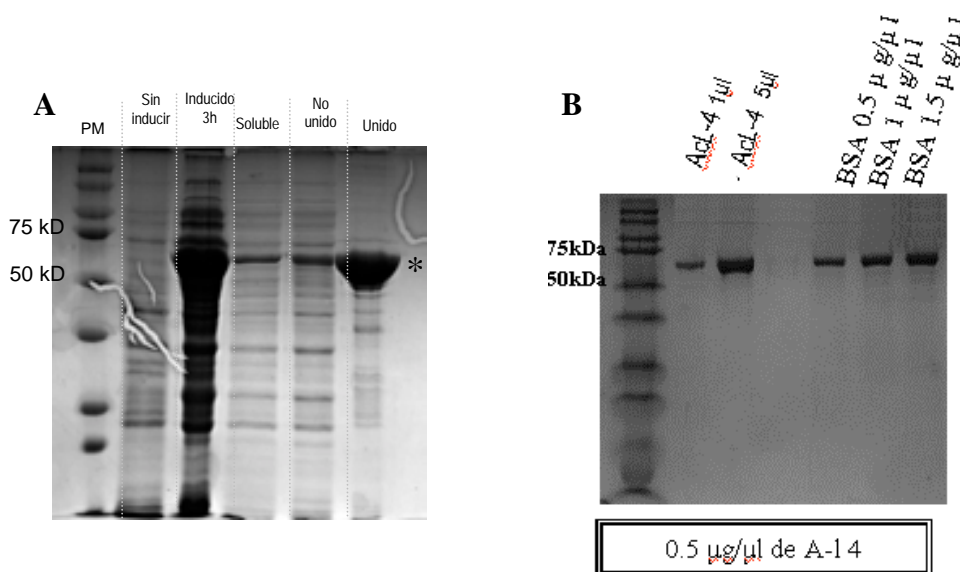
**Figura 24** *A* Fracción soluble del lisado proteico con sarkosyl, *T*- muestras a las que se les agregó Tritón x-100 al 4%. *B*. Fracción insoluble del lisado proteico con sarkosyl. *T*- muestras a las que se les agregó Tritón x-100 al 4% *C* Lisados tratados con Tritón X-100. Todas las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% y teñidas con azul de coomasie.

### ***Estandarización del protocolo de purificación***

Una vez que se definieron las condiciones óptimas de expresión y solubilización de la proteína, se prosiguió a la purificación de ésta del lisado mediante cromatografía de afinidad utilizando Glutación inmovilizado en sefarosa. La proteína unida al glutación no está limpia (Figura 25A), tiene muchas otras proteínas, por lo que se hizo una segunda purificación: se corrió la muestra en geles preparativos de acrilamida, se cortó la banda correspondiente a la proteína (indicada con un asterisco en la figura 25A), se electroeluyó la proteína y se dializó.



La proteína fusión pura se cuantificó con Estándares de albúmina bovina (BSA por sus siglas en inglés) y mediante densitometría. (Figura 25B)



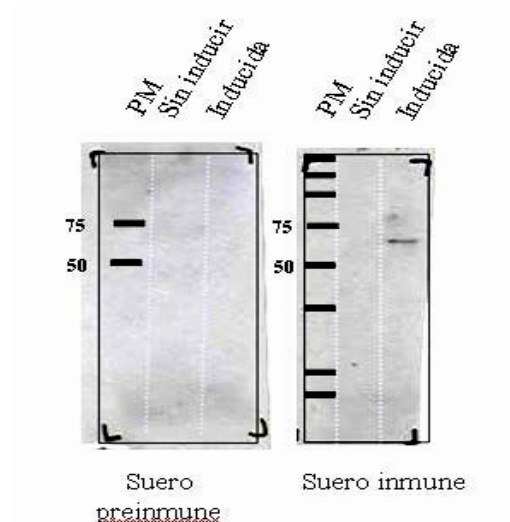
**Figura 25. Purificación de la proteína** Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie que muestra el proceso de purificación de la proteína **A** 1. Marcador de pesos moleculares. 2. proteína sin inducir. 3. proteína inducida. 4. fracción soluble obtenida con sarkosyl al 0.5% y tratada con tritónX-100 al 4%, 5. Fracción no unida a la sefarosa. 6. Fracción unida a la sefarosa. **B** Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie en el que se cuantificó la proteína recombinante GST-AcL-4 pura, utilizando una curva de estándares de BSA

### ***Inoculación del conejo***

Con la proteína pura se inoculó un conejo para obtener anticuerpos policlonales. Se inoculó tres veces con espacio de dos meses entre cada inoculación, a las 2 semanas de la última inoculación se sangró el conejo para obtener suero.

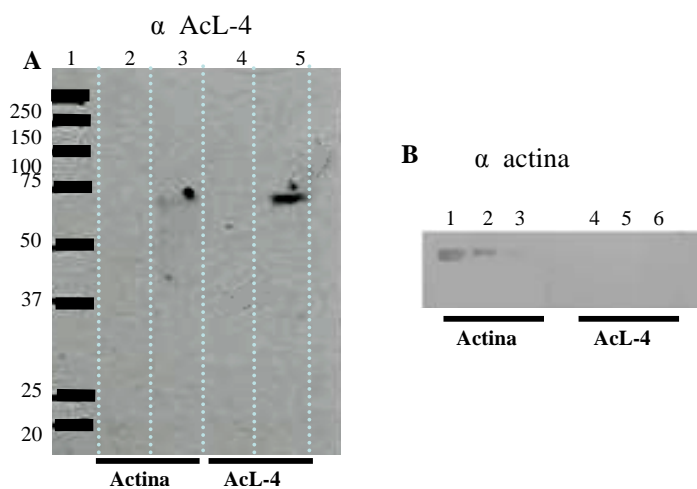
### ***Caracterización del suero policlonal***

Se caracterizó el suero policlonal de conejo haciendo un ensayo de inmunquímica contra la proteína recombinante, este suero solo reconoce una banda de 68.67 kD (Figura 26) presente en el cultivo en donde la expresión de la proteína recombinante fue inducida con IPTG. Tanto el suero policlonal como el preimmune no reconocen proteínas bacterianas.



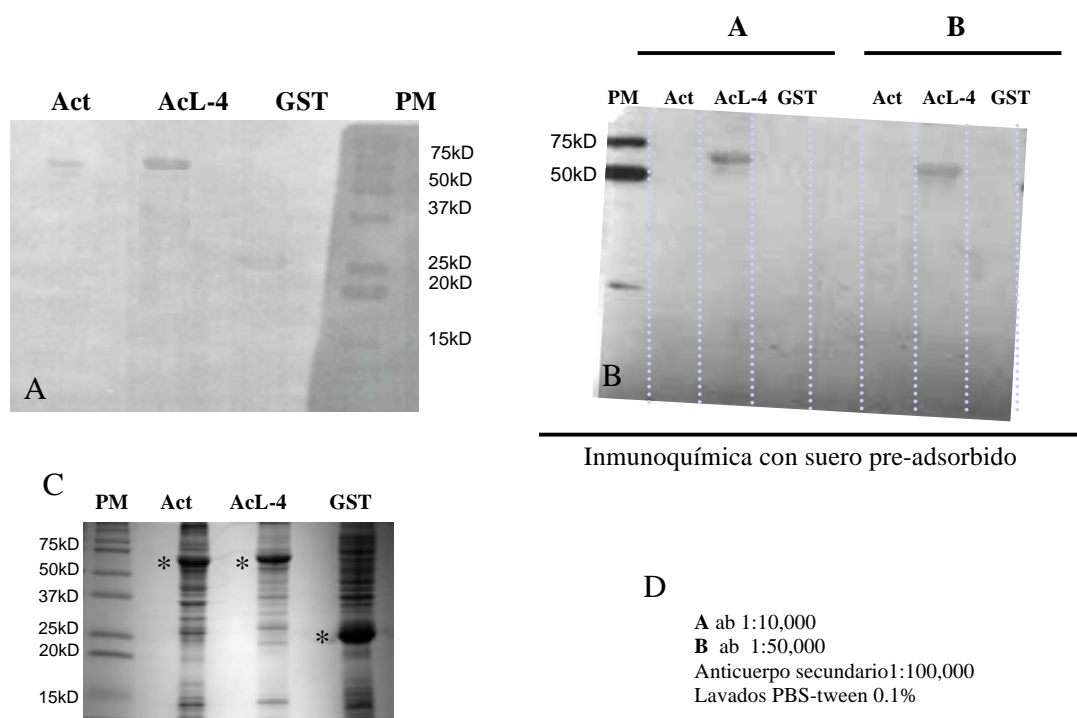
**Figura 26** Ensayo de inmunoquímica en condiciones reductoras, contra lisados de *E. coli* sin inducir e inducidos con IPTG. Se utilizó el suero preinmune como control. Vemos que el suero preinmune no reconoce ninguna proteína, mientras que el suero inmune reconoce una banda de 68.67 kDa que concuerda con el tamaño de la proteína fusión. AcL-4 pesa 42.1 kDa y GST 26.57 kDa.

Debido a la similitud de estructura tridimensional entre la Actina convencional de *T. cruzi* y la AcL-4, se hizo un ensayo de inmunoquímica contra GST-Actina recombinante y contra GST-AcL-4 recombinante con el suero policlonal de conejo contra AcL-4 y otro ensayo contra el suero policlonal de conejo contra actina (figura 27). Se observó que el suero contra Actina no reconoce a la proteína recombinante AcL-4; sin embargo el suero policlonal contra AcL-4 presenta un ligero reconocimiento a GST-Actina (Figura 27).



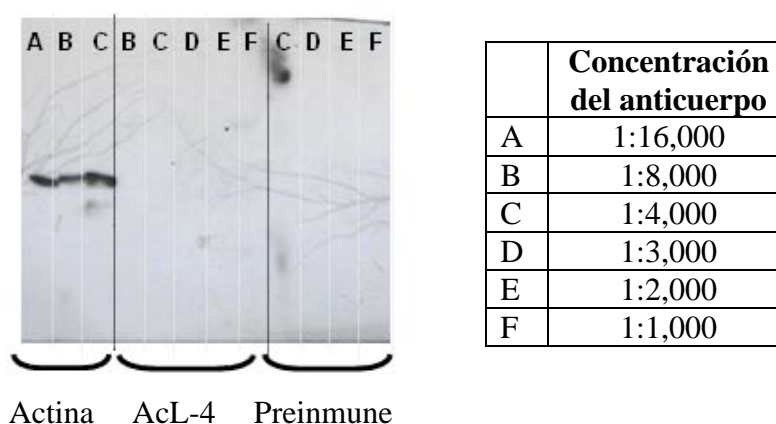
**Figura 27** A ensayo de inmunoquímica de las proteínas Actina y AcL-4 recombinantes con el suero contra AcL-4. 1 marcador de pesos moleculares, 2 Actina sin inducir, 3 Actina inducida 3 horas, 4 AcL-4 sin inducir, 5 AcL-4 inducida 3 horas. B ensayo de inmunoquímica de las proteínas recombinantes Actina y AcL-4 con el suero contra Actina. 1 Actina, 2 Actina diluida 1:10, 3 Actina diluida 1:100, 4 AcL-4, 5 AcL-4 diluida 1:10, 6 AcL-4 diluida 1:100.

Debido a que ambos anticuerpos se obtuvieron al utilizar proteínas fusión con GST el reconocimiento puede estar dado por la fracción GST de la proteína. Para determinar si el suero reconoce este fragmento, se hizo un estudio de inmunoquímica en el que se demostró que el suero reconoce a GST en cultivos inducidos que solo contienen el plásmido pGEX-3x sin proteína fusión (figura 20A). Como controles se pusieron cultivos inducidos que expresan tanto GST-actina como GST-AcL-4 (figura 28A). El anticuerpo reconoce a la GST, a la proteína recombinante GST-AcL-4 y ligeramente a la proteína recombinante GST-Actina. Debido a este resultado se decidió pre-adsorber el suero policlonal  $\alpha$ -AcL-4 con GST. Una vez pre-adsorbido se repitió este ensayo y vemos que el anticuerpo deja de reconocer tanto al GST como a la actina de *T. cruzi*. (Figura 28)



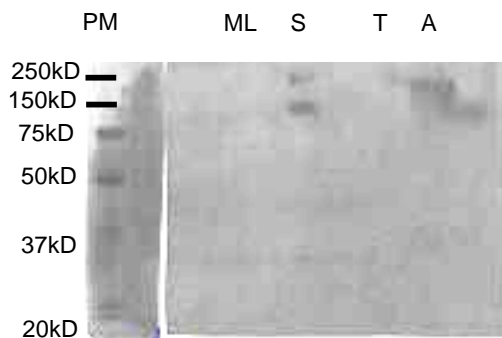
**Figura 28 Reconocimiento del fragmento GST por el suero policlonal  $\alpha$ -AcL-4.** **A** Ensayo de inmunoquímica contra las proteínas GST, GST-AcL-4 y GST-Actina con el suero policlonal contra AcL-4. **B** Ensayo de inmunoquímica contra las proteínas GST, GST-AcL-4 y GST-Actina con el suero policlonal contra AcL-4 pre-adsorbido con GST. **C** SDS-PAGE 10% en donde se muestran las cantidades de proteína utilizadas para los ensayos de inmunoquímica. Las proteínas inducidas se señalan con un asterisco **D** se muestran las concentraciones de anticuerpos utilizadas con el suero pre-adsorbido (con el procedimiento realizado disminuyó considerablemente el título del anticuerpo)

Una vez demostrado que el suero policlonal reconoce AcL-4 recombinante, mediante ensayos de inmunquímica, se buscó a la proteína en epimastigotes de *T. cruzi*. Como controles se utilizaron el anticuerpo contra actina convencional y el suero preinmune. En epimastigotes no se ve ninguna banda (Figura 29).



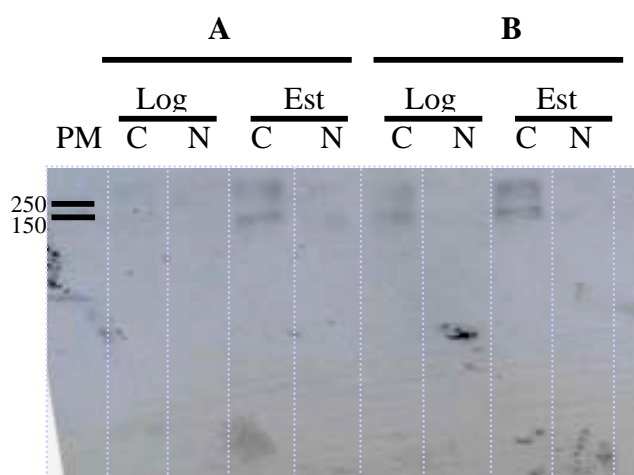
**Figura 29** Ensayo de inmunquímica contra proteínas totales de epimastigotes de *T. cruzi*, con diferentes diluciones de suero policlonal. Como controles se utilizaron el suero contra GST-Actina y el preinmune

Ya que la falta de reconocimiento de una proteína del tamaño esperado puede deberse a que esta no se traduzca en estas condiciones, se investigó si esta se expresa en epimastigotes de fase estacionaria, tripomastigotes y amastigotes (figura 30). En epimastigotes de fase estacionaria se reconoce una banda de 150 kD y una mayor a 250 kD. En amastigotes también reconoce una banda mayor a 250kD. En estos estudios se utilizó el suero sin pre-adsorber. Los epítopes reconocidos podrían encontrarse en proteínas parasíticas similares a GST, ya que su tamaño es mayor al esperado para AcL-4. Faltaría repetir el experimento con suero pre-adsorbido, esto se hará en cuanto sea posible obtener extractos proteicos de tripomastigotes y amastigotes, los cuales son cosechados en el laboratorio de la Dra. Manning.



**Figura 30.** Inmunoquímica de proteínas totales de *T. cruzi* en distintos estadios. ML. Epimastigotes en fase de crecimiento media logarítmica. S epimastigotes en crecimiento estacionario. T. trypomastigotes. A. amastigotes

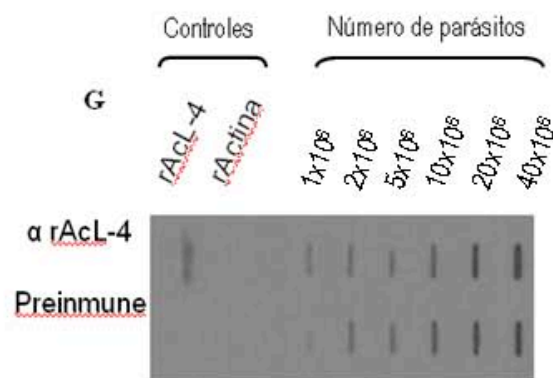
Otra posibilidad por la que no se identifique la proteína es que se encuentre en poca cantidad, por debajo de los niveles detectables en estudios de inmunoquímica. El fraccionamiento del lisado en dos fracciones: citoplasmática y nuclear; permite aumentar la cantidad de proteína por muestra. Además se puede deducir el compartimiento celular en donde se localizaría la proteína. Se hizo una separación en fracciones citoplasmáticas y nucleares ya que se sabe que algunas proteínas de la familia de las actinas son citoplasmáticas, mientras que otras son nucleares [37, 38]. En este ensayo vemos que el anticuerpo (sin adsorber) reconoce las bandas antes descritas en la fracción citoplasmática y no en la nuclear. Esto se hace más evidente en extractos citoplasmáticos en fase estacionaria y cuando se incrementa cantidad de anticuerpo utilizado (figura 31 panel B).



**Figura 31.** Estudios de inmunoquímica en extractos protéicos de citoplasma y de núcleo tanto en fase logarítmica como en estacionaria. El estudio se hizo con distintas concentraciones del suero inmune (sin pre-adsorber). **A** 1:8,000. **B** 1:4,000. C corresponde a la fracción citoplasmática y N a la fracción nuclear.

### *Dot Blot*

Por recomendación de la Dra. Manning quien en su experiencia ha encontrado, en estudios de inmunoquímica, proteínas que son reconocidas en su forma recombinante, pero no en su forma nativa, se hicieron estudios tipo dot-blot para saber de manera rápida si la falta de reconocimiento es debido a las condiciones denaturalizantes en la que se llevan a cabo los ensayos de inmunoquímica, se hicieron estudios tipo Dot blot con parásitos intactos. Se fijaron muestras de 40, 20, 10, 5, 2 y 1 millones de parásitos en membranas de nitrocelulosa y se hicieron ensayos de inmunoquímica con estas membranas, se utilizó el suero preinmune y el suero contra AcL-4. Como control se utilizaron muestras provenientes de cultivos inducidos de *E. coli* expresando rAcL-4 y rActina de *T. cruzi* (figura 32). Vemos que el suero preinmune está reconociendo a los parásitos, pero no reconoce a la proteína recombinante. El suero policlonal contra AcL-4 reconoce a los parásitos y a la proteína recombinante AcL-4 pero no a rActina. Esta aproximación no nos da información para saber si los problemas en el western blot son debido a la ausencia de la proteína o a las condiciones desnaturalizantes del ensayo, se deben hacer ensayos de inmunoquímica con geles nativos. Ya que el suero preinmune también reconoce agentes nativos en epimastigotes de *T. cruzi*, sería necesario hacer estudios de inmunohistoquímicas para determinar si reconoce el mismo patrón o existen diferencias específicas de localización.



**Figura 32.** Ensayos tipo dot blot con parásitos de *T. cruzi*. Vemos las distintas concentraciones de parásitos. El carril superior se hibridó con el suero contra rAcL-4 y el inferior con el preinmune

---

---

**Discusión**

En el laboratorio se tiene interés en estudiar el papel que juega actina en *T. cruzi*. De todas las actinas y proteínas similares a actina identificadas en el proyecto del genoma, solo hay evidencia de la expresión de dos de ellas: de la actina convencional ya caracterizada en el laboratorio y de una actina atípica anotada en el genoma como actin-like protein 4. La evidencia de expresión de la actina convencional es experimental y se sabe que se expresa en los tres estadios de *T. cruzi*. La evidencia de expresión de AcL-4 es a través de la detección de dos clonas de EST's reportadas en el genoma, es por ello que se decidió iniciar su caracterización. Para ello se obtuvo a partir de DNA genómico una sonda homóloga, la cual fue muy útil tanto para determinar el contexto genómico de esta secuencia como para estudios de expresión. Ya que la cepa CLBrenner que tenemos en el laboratorio, uno de los alelos que codifica para la proteína ribosomal S4 es diferente al reportado en el proyecto del genoma [66] era necesario caracterizar si existían diferencias en el locus de AcL-4. El mapa de restricción de esta región parece estar conservado. Sin embargo a nivel de secuencia si se identificaron algunos cambios en la región codificadora del alelo No Esmeraldo existe un cambio a nivel de DNA, pero no de proteína; mientras que en el alelo Esmeraldo, existen dos cambios uno conservado y uno no conservado. Para los estudios de expresión de la proteína se utilizó el alelo No Esmeraldo que codifica para una proteína idéntica a la reportada en la base de datos del proyecto del genoma. Posteriormente decidimos demostrar que este gene es funcional en nuestra cepa, pudiendo demostrar la presencia de mRNA al menos en epimastigotes y tripomastigotes.

Para ver si se expresa a nivel de proteína, se obtuvo un suero policlonal contra una proteína fusión rAcL-4. El suero policlonal funciona, puesto que reconoce a la

---

---

proteína recombinante, sin embargo, tenía un poco de reacción cruzada con la rActina de *T. cruzi* debido a que ambas proteínas tienen fusionado GST, al adsorber el suero con GST se terminó con el reconocimiento cruzado; sin embargo no se ha podido identificar a la proteína nativa, esto puede tener dos explicaciones: 1) El mRNA es sometido a un mecanismo de regulación postranscripcional propio del parásito. Para saber esto se pueden hacer estudios de unión del mRNA a polisomas, si se ve que el mRNA está unido a polisomas, significa que el mRNA se traduce y por lo tanto podemos variar todas las condiciones hasta encontrar la proteína, lo que nos lleva a la segunda explicación. 2) No hemos sido capaces de dar con las condiciones del estudio para localizar a la proteína. Esto puede ser debido a que el anticuerpo no reconozca a la proteína en estudios de inmunoquímica, pero si en estudios de inmunohistoquímica, también puede ser que la proteína se encuentre en muy bajas concentraciones por lo que no es detectable en ensayos de inmunoquímica, otra posibilidad es que debido a las condiciones en que se tienen a los parásitos en el laboratorio, no se exprese la proteína ya que falta alguna señal que estimule su expresión.

En cuanto al análisis de la secuencia deducida de aminoácidos, se ve que a pesar de que la secuencia de AcL-4 posee tan solo un 54% de similitud con la actina de *T. cruzi*; la proteína posee muchas características de las actinas típicas: varios algoritmos la reconocen como actina, su estructura es muy parecida, tiene conservados los sitios de unión a: ATP, gelsolina y profilina, al hacer un BLAST de la secuencia de la proteína en el sitio de NCBI, al menos las primeras 2,000 secuencias más parecidas son de actinas. Sin embargo, los sitios de unión entre monómeros no están muy conservados, tiene una inserción de 6 aminoácidos en un sitio muy importante para la estabilidad de los filamentos (el loop H), por lo que para determinar si esta proteína es



---

---

capaz de formar filamentos se deben hacer estudios de polimerización *in vitro*. Sin embargo existen proteínas con poca similitud en secuencia con la actina y que son capaces de formar filamentos, como la actina de *L. major* (homóloga a la actina de *T. cruzi* reportada por nuestro grupo de trabajo).

Se ha concebido a la actina como una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución, compuesta por aproximadamente 375 residuos, capaz de formar filamentos y llevar a cabo funciones muy estudiadas como son la motilidad celular, división celular, endocitosis y exocitosis; sin embargo con la reciente secuenciación masiva de genomas de microorganismos, se ha visto la existencia de un gran grupo de proteínas que en secuencia no se parecen a la actina “canónica”, sin embargo son reconocidas como actinas por algoritmos elaborados específicamente para identificar actinas. Estas proteínas conservan la estructura de unión a ATP, los sitios de unión a proteínas moduladoras de actina, su estructura es muy parecida a una actina, poseen los sitios potenciales de unión entre monómeros; sin embargo se conoce poco su función.

En organismos como *T. cruzi* en donde las funciones típicas de la actina son llevadas a cabo por otras proteínas y nunca se han visto filamentos[67], se puede suponer que esta proteína tenga una función propia; sin embargo cualquiera que sea su función, ¿se debe denominar actina, debido a sus similitudes estructurales con esta proteína? o ¿solo es una proteína que comparte algunas estructuras con la actina, por lo que solo es parecida a actina? Con el creciente número de casos como este [65, 68-72] es pertinente re-definir qué es una actina, qué tan parecidas deben ser las proteínas a la actina “canónica” para denominarse actinas (porcentajes de similitud y similitud). ¿Una actina es una proteína que posea una determinada similitud a la secuencia de la proteína canónica, o es una proteína que cumpla con las funciones de la actina “canónica”, es decir que forme filamentos, que interaccione con miosina, que una faloidina, que esté

involucrada en algún proceso en los que se ha descrito la presencia de las actinas? y ¿qué es una proteína parecida a actina; una proteína que es reconocida por los algoritmos de actinas, pero que se desconoce su función?

Es importante definir qué proteínas pertenecen a las actinas y cuales son las proteínas parecidas a actinas, ya que no está definido. El término proteína parecida a actina (Actin-like protein) sólo se encuentra en las bases de datos de genomas en donde los algoritmos reconocen a la proteína como actina, pero en secuencia no posee una alta similitud a la actina canónica.

## Conclusiones

*T. cruzi* posee el gene AcL-4 correspondiente a una proteína perteneciente a la familia de las actinas, el gene se transcribe en un mRNA de 1.6 kb, presente al menos en epimastigotes y tripomastigotes. La secuencia de la proteína es reconocida por algoritmos como una proteína perteneciente a la familia de las actinas, tiene conservados sitios característicos como el pliegue de unión a ATP y el sitio de unión a varias proteínas moduladoras de la actina. No se pudo demostrar la expresión de este gen a nivel de proteína en epimastigotes.

Para continuar este trabajo se debe definir si el transcrito es traducido o es degradado mediante algún proceso de regulación postranscripcional. Si el mRNA se traduce, se deben hacer un western blot en condiciones no desnaturizantes, estudios de inmunolocalización para tener una idea de la localización y función de la proteína. Es importante realizar estos estudios en todos los estadios del parásito ya que su expresión puede ser estadio específica. Para determinar si la proteína es una actina, se pueden hacer estudios de polimerización *in vitro*.

---

---

## Perspectivas

Se tiene que determinar si el mRNA de AcL-4 es degradado mediante algún sistema de regulación postranscripcional y nunca llega a proteína o si se traduce y simplemente no hemos sido capaces de identificarla en epimastigotes. Para identificar si el mRNA está siendo sometido a algún sistema de regulación se puede ver si el mRNA está unido a polisomas.

Si encontramos al mRNA unido a polisomas, significa que se traduce, por lo que se procedería a buscar la proteína. Para esto se pueden hacer estudios de inmunohistoquímica en los distintos estadios del parásito, para ver en que estadios se localiza AcL-4. Para ver la localización de la proteína *in vivo* se puede hacer una fusión de la proteína con una etiqueta fluorescente. Una vez identificada la proteína se pueden hacer muchos experimentos para iniciar la caracterización. Se pueden hacer reemplazos de la proteína, sobre-expresar la proteína, hacer pull-downs para ver con que interactúa.

## Bibliografía

1. Velasco-Castrejón, Guzmán-Bracho, Ibañez-Bernal: **Enfermedades Tropicales en México**. Instituto de Diagnostico y referencia epidemiologico 1994:279-292.
2. Velasco-Castrejon: **La Enfermedad de Chagas**. Publicación técnica del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas 1991.
3. Vaelasco-Castrejón, Salazar-Schetino: **Enfermedad de Chagas en México**. In: *International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae: 1996; Santo Domingo de los Colorados, Ecuador*: CJ Schofield, JP Dujardin J Jurberg; 1996.
4. Carrada-Bravo T: **Trypanosoma cruzi: Historia natural y diagnóstica de la Enfermedad de Chagas**. *Revista Mexicana de Parasitología Clínica* 2004, **51**(4):205-219.
5. Cevallos AM, Lopez-Villasenor I, Espinosa N, Herrera J, Hernandez R: **Trypanosoma cruzi: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts**. *Exp Parasitol* 2003, **103**(1-2):27-34.
6. Guhl F, Lazdins J: **Reporte Sobre la Enfermedad de Chagas**. WHO 2007.
7. Dacks JB, Walker G, Field MC: **Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists**. *Parasitol Int* 2008, **57**(2):97-104.
8. Cavalier-Smith T: **Only six kingdoms of life**. *Proc Biol Sci* 2004, **271**(1545):1251-1262.
9. Brener Z: **Immunity to Trypanosoma cruzi**. *Adv Parasitol* 1980, **18**:247-292.
10. Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B *et al*: **Brazilian isolates of Trypanosoma cruzi from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences**. *Am J Trop Med Hyg* 1998, **58**(6):807-811.
11. Nunes LR, de Carvalho MR, Buck GA: **Trypanosoma cruzi strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters**. *Mol Biochem Parasitol* 1997, **86**(2):211-224.
12. Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD: **Probing the genetic population structure of Trypanosoma cruzi with polymorphic microsatellites**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(7):3776-3780.
13. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B: **DNA markers define two major phylogenetic lineages of Trypanosoma cruzi**. *Mol Biochem Parasitol* 1996, **83**(2):141-152.
14. Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O: **Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences**. *Int J Parasitol* 1998, **28**(1):105-112.
15. Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M: **Identification of six Trypanosoma cruzi lineages by sequence-characterised amplified region markers**. *Mol Biochem Parasitol* 2000, **111**(1):95-105.
16. Westenberger SJ, Barnabe C, Campbell DA, Sturm NR: **Two hybridization events define the population structure of Trypanosoma cruzi**. *Genetics* 2005, **171**(2):527-543.

17. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R *et al*: **The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major***. *Science* 2005, **309**(5733):436-442.
18. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renault H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B *et al*: **The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei***. *Science* 2005, **309**(5733):416-422.
19. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G *et al*: **The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease**. *Science* 2005, **309**(5733):409-415.
20. Atwood JA, 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL: **The *Trypanosoma cruzi* proteome**. *Science* 2005, **309**(5733):473-476.
21. Zingales B, Pereira ME, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP, Vargas N, Cano MI, da Silveira JF, Nehme NS *et al*: ***Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener**. *Acta Trop* 1997, **68**(2):159-173.
22. Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL: **Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome**. *BMC Genomics* 2009, **10**:255.
23. Kevin MT, Miles MA: **American Trypanosomiasis**, vol. 7: Kluwer Academic Publishers; 2002.
24. Tyler KM, Engman DM: **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited**. *Int J Parasitol* 2001, **31**(5-6):472-481.
25. Zeledon R, Alvarenga N, Schonsinsky K: **Chagas Disease**. *Pan American Health Organization* 1997:347-359.
26. Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN: **Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man**. *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**(3):251-261.
27. Stiles JK, Hicock PI, Shah PH, Meade JC: **Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania***. *Ann Trop Med Parasitol* 1999, **93**(8):781-807.
28. Teixeira SM: **Control of gene expression in Trypanosomatidae**. *Braz J Med Biol Res* 1998, **31**(12):1503-1516.
29. da Silva RA, Bartholomeu DC, Teixeira SM: **Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi***. *Int J Parasitol* 2006, **36**(1):87-96.
30. Furger A, Schurch N, Kurath U, Roditi I: **Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation**. *Mol Cell Biol* 1997, **17**(8):4372-4380.
31. Goldenberg S, Salles JM, Contreras VT, Lima Franco MP, Katzin AM, Colli W, Morel CM: **Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi***. *FEBS Lett* 1985, **180**(2):265-270.
32. Holetz FB, Correa A, Avila AR, Nakamura CV, Krieger MA, Goldenberg S: **Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi***. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **356**(4):1062-1067.
33. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz: **Cell Biology**. In., 2nd edn: Elsevier; 2007.
34. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (eds.): **Molecular Biology of the Cell**, 4th edition edn: Garland Publishing; 2004.

35. Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB: **Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton.** *J Cell Biol* 2000, **150**(5):F111-116.
36. Goode BL, Drubin DG, Barnes G: **Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons.** *Curr Opin Cell Biol* 2000, **12**(1):63-71.
37. Percipalle P, Fomproix N, Kylberg K, Miralles F, Bjorkroth B, Daneholt B, Visa N: **An actin-ribonucleoprotein interaction is involved in transcription by RNA polymerase II.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(11):6475-6480.
38. Zhang S, Buder K, Burkhardt C, Schlott B, Gorlach M, Grosse F: **Nuclear DNA helicase II/RNA helicase A binds to filamentous actin.** *J Biol Chem* 2002, **277**(1):843-853.
39. Sheterline P, Clayton J, Sparrow J: **Actin Protein Profile**, fourth edn: Oxford University Press; 1994.
40. Kabsch W, Holmes KC: **The actin fold.** *Faseb J* 1995, **9**(2):167-174.
41. Pantaloni D, Carlier MF: **How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4.** *Cell* 1993, **75**(5):1007-1014.
42. Pollard TD, Cooper JA: **Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions.** *Annu Rev Biochem* 1986, **55**:987-1035.
43. Goldschmidt-Clermont PJ, Furman MI, Wachsstock D, Safer D, Nachmias VT, Pollard TD: **The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells.** *Mol Biol Cell* 1992, **3**(9):1015-1024.
44. Labbe JP, Harricane MC, Boyer M, Derancourt J, Roustan C, Benyamin Y: **Biochemical evidence for the presence of an unconventional actin protein in a prokaryotic organism.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1996, **114**(3):287-293.
45. Guerrero-Barrera AL, Garcia-Cuellar CM, Villalba JD, Segura-Nieto M, Gomez-Lojero C, Reyes ME, Hernandez JM, Garcia RM, de la Garza M: **Actin-related proteins in Anabaena spp. and Escherichia coli.** *Microbiology* 1996, **142** ( Pt 5):1133-1140.
46. Kandasamy MK, Deal RB, McKinney EC, Meagher RB: **Plant actin-related proteins.** *Trends Plant Sci* 2004, **9**(4):196-202.
47. Blessing CA, Ugrinova GT, Goodson HV: **Actin and ARPs: action in the nucleus.** *Trends Cell Biol* 2004, **14**(8):435-442.
48. Holmes KC, Sander C, Valencia A: **A new ATP-binding fold in actin, hexokinase and Hsc70.** *Trends Cell Biol* 1993, **3**(2):53-59.
49. Garcia-Salcedo JA, Perez-Morga D, Gijon P, Dilbeck V, Pays E, Nolan DP: **A differential role for actin during the life cycle of Trypanosoma brucei.** *Embo J* 2004, **23**(4):780-789.
50. De Melo LD, Sant'Anna C, Reis SA, Lourenco D, De Souza W, Lopes UG, Cunha-e-Silva NL: **Evolutionary conservation of actin-binding proteins in Trypanosoma cruzi and unusual subcellular localization of the actin homologue.** *Parasitology* 2008, **135**(8):955-965.
51. Camargo EP: **Growth and Differentiation in Trypanosoma Cruzi. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1964, **12**:93-100.
52. Sambrook, DW R: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.**: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.; 2001.

53. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**(1):156-159.
54. Frangioni JV, Neel BG: **Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins.** *Anal Biochem* 1993, **210**(1):179-187.
55. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(17):3389-3402.
56. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schaffer AA, Yu YK: **Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices.** *Febs J* 2005, **272**(20):5101-5109.
57. de Arruda MV, Matsudaira P: **Cloning and sequencing of the Leishmania major actin-encoding gene.** *Gene* 1994, **139**(1):123-125.
58. Clarke M, Schatten G, Mazia D, Spudich JA: **Visualization of actin fibers associated with the cell membrane in amoebae of Dictyostelium discoideum.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975, **72**(5):1758-1762.
59. Eckert BS, Lazarides E: **Localization of actin in Dictyostelium amebas by immunofluorescence.** *J Cell Biol* 1978, **77**(3):714-721.
60. Eckert BS, Warren RH, Rubin RW: **Structural and biochemical aspects of cell motility in amebas of Dictyostelium discoideum.** *J Cell Biol* 1977, **72**(2):339-350.
61. Guillen N, Carlier MF, Brugerolle G, Tardieux I, Ausseil J: **[Cytoskeletal actin and its associated proteins. Some examples in Protista].** *Parasite* 1998, **5**(2):107-117.
62. Kelley LA, Sternberg MJ: **Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.** *Nat Protoc* 2009, **4**(3):363-371.
63. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ: **Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments.** *Physiol Rev* 2003, **83**(2):433-473.
64. Kim E, Wriggers W, Phillips M, Kokabi K, Rubenstein PA, Reisler E: **Cross-linking constraints on F-actin structure.** *J Mol Biol* 2000, **299**(2):421-429.
65. Kapoor P, Sahasrabudhe AA, Kumar A, Mitra K, Siddiqi MI, Gupta CM: **An unconventional form of actin in protozoan hemoflagellate, Leishmania.** *J Biol Chem* 2008, **283**(33):22760-22773.
66. Perez-Escobar M, Cevallos AM, Espinoza B, Espinosa N, Martinez I, Hernandez R: **Trypanosoma cruzi ribosomal protein S4: characterization of its coding locus, analysis of transcripts, and antigenicity of the protein.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, **102**(4):473-479.
67. Gull K: **The cytoskeleton of trypanosomatid parasites.** *Annu Rev Microbiol* 1999, **53**:629-655.
68. Gordon JL, Sibley LD: **Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites.** *BMC Genomics* 2005, **6**:179.
69. Hirono M, Uryu S, Ohara A, Kato-Minoura T, Kamiya R: **Expression of conventional and unconventional actins in Chlamydomonas reinhardtii upon deflagellation and sexual adhesion.** *Eukaryot Cell* 2003, **2**(3):486-493.
70. Kato-Minoura T, Uryu S, Hirono M, Kamiya R: **Highly divergent actin expressed in a Chlamydomonas mutant lacking the conventional actin gene.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **251**(1):71-76.



71. Kato-Minoura T, Okumura M, Hirono M, Kamiya R: **A novel family of unconventional actins in volvocalean algae.** *J Mol Evol* 2003, **57**(5):555-561.
72. Sahasrabuddhe AA, Bajpai VK, Gupta CM: **A novel form of actin in Leishmania: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules.** *Mol Biochem Parasitol* 2004, **134**(1):105-114.