



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN DE PROFILINA EN *Trypanosoma cruzi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

JUAN FELIPE OSORIO MÉNDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: **DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS**
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: **DR. ROBERTO JOSE RAFAEL HERNANDEZ**
FERNANDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS
DR. SANTIAGO MARTINEZ CALVILLO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN DE PROFILINA EN *Trypanosoma cruzi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

JUAN FELIPE OSORIO MÉNDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: **DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS**
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: **DR. ROBERTO JOSE RAFAEL HERNANDEZ**
FERNANDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS
DR. SANTIAGO MARTINEZ CALVILLO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE, 2012

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 10 de septiembre de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **OSORIO MENDEZ JUAN FELIPE** con número de cuenta **511451366** con la tesis titulada **"CARACTERIZACION DE PROFILINA EN *Trypanosoma cruzi*"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA MARIA CEVALLOS GAOS**:

Presidente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Vocal: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNANDEZ
Secretario: DR. SANTIAGO MARTINEZ CALVILLO
Suplente: DR. ROBERTO JOSE RAFAEL HERNANDEZ FERNANDEZ
Suplente: DRA. ROSAURA HERNANDEZ RIVAS

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de Noviembre de 2012.

María del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

- Al posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM.
- A la financiación recibida por el donativo de Conacyt 79815 para el proyecto "Caracterización de genes que codifican para actina, proteínas similares a actina y su expresión en diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi*".
- Al Conacyt por financiar los estudios de Juan Felipe Osorio Méndez a través de una beca otorgada para estudios de maestría (número de becario 245674).
- Al apoyo financiero PAEP recibido para presentar los resultados de este trabajo en el XX Congreso Latinoamericano de Parasitología, realizado del 27 de Septiembre al 1 de Octubre de 2011.
- A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Santiago Martínez Calvillo, Dr. Roberto Hernández y Dra. Ana María Cevallos, por enriquecer mi proyecto y desarrollo académico.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

- A mi familia por el apoyo incondicional, sin el cual no habría alcanzado esta meta.
- A mis grandes amigos Amanda, Ernesto y Tomás, así como a todas las personas con las que he compartido estos dos años, por todo lo vivido.
- A mis compañeros de laboratorio (Andrea, Ernesto, Tomás, Alfredo, Israel, Juliana y Esteban) por su apoyo académico y amistad.
- A la Dra. Imelda López y a los integrantes de su laboratorio por sus valiosos comentarios durante el desarrollo de este proyecto.
- Al Dr. Roberto Hernández por permitirme ser parte de su laboratorio.
- Al Dr. Federico Sánchez y al Biol. Juan Elías Olivares Grajales por su apoyo con el protocolo para la purificación de la profilina nativa.
- Al Dr. Santiago Martínez Calvillo y al Biol. Luis Enrique Florencio Martínez por las células de *T. brucei* y *L. major*.
- Al Dr. Miguel Ángel Cevallos por proporcionarnos los vectores de expresión pGEX4T1 y pMALc2x y por su ayuda con las clonaciones.
- Al M.V.Z. Jorge García Rebollar del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su apoyo en los protocolos de manejo de los animales de laboratorio para la producción de anticuerpos.
- A la M.Cs. Juliana Herrera López por su apoyo técnico general.
- Especialmente a la Dra. Ana María Cevallos por su confianza, enseñanzas y por brindarme la gran oportunidad de investigar y aprender a su lado.

**Dedicado a mi abuela Lilia
por su fortaleza y amor infinito**

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPs: Proteína de unión a actina. Del ingles *Actin binding proteins*.

Actina F: Actina filamentosa.

Actina G: Actina globular.

ADF: Factor despolimerizador de la actina. Del ingles *Actin depolymerizing factor*.

ALPs: Proteínas similares a actina. Del ingles *Actin like proteins*.

ARPs: Proteínas relacionadas con actina. Del ingles *Actin Related Proteins*.

BB: Cuerpos basales. Del ingles *Basal bodies*.

Ena/VASP: Fosfoproteína estimulada por vasodilatador. Del ingles *Vasodilator-stimulated phosphoprotein*.

FAB: Dominio de unión con actina F. Del ingles *F-actin binding domain*.

FAZ: Zona de anclaje flagelar. Del ingles *Flagellar attachment zone*.

FH-2: Dominio con homología a forminas-2. Del ingles *Formin homology domain-2*.

GAB: Dominio de unión con actina G. Del ingles *G-actin binding domain*.

NPFs: Factores promotores de la nucleación. Del ingles *Nucleation promoting factors*.

PFR: Barra paraflagelar. Del ingles *Paraflagellar rod*.

PMT: Corsé subpelicular. Del ingles *Subpellicular microtubules*.

WASP: Proteína del síndrome Wiskott-Aldrich. Del ingles *Wiskott–Aldrich syndrome protein*

WH-2: Dominio con homología a WASP-2. Del ingles *Wiskott-Aldrich syndrome homology domain-2*.

ÍNDICE

1. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	11
2. RESUMEN	13
3. ABSTRACT	14
4. INTRODUCCIÓN	15
4.1. Citoesqueleto eucariota	15
4.2. Actina	16
4.2.1. Polimerización de actina	17
4.2.2. Proteínas reguladoras de la dinámica de polimerización de la actina	19
4.3. Profilina	22
4.3.1. Estructura de profilina y ligandos	22
4.3.2. Profilina en la célula	26
4.4. Trypanosoma cruzi	29
4.4.1. Importancia biomédica	29
4.4.2. Ciclo de vida	30
4.4.3. Citoesqueleto	31
4.4.4. Actina	33
4.4.5. Profilina y otras proteínas reguladoras de la dinámica de actina	33
5. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1. Obtención de parásitos	38
6.2. Generación de transfectantes estables de <i>T. cruzi</i>	38
6.2.1. Construcción de vectores para la expresión de mCherry-profilina en <i>T. cruzi</i>	38
6.2.2. Transfección de epimastigotes y selección de parásitos recombinantes	40
6.2.3. Caracterización de parásitos recombinantes	40

6.3. Obtención de la profilina nativa de <i>T. cruzi</i> por cromatografía de afinidad	41
6.3.1. <i>Obtención de extractos de proteína de T. cruzi</i>	41
6.3.2. <i>Cromatografía de afinidad por poli-prolinas</i>	41
6.4. Expresión y purificación de profilina recombinante	42
6.4.1. <i>Construcción de vectores para expresión de profilina recombinante en E. coli</i>	42
6.4.2. <i>Expresión y purificación de profilina fusionada a la glutatión S- transferasa (GST)</i>	43
6.4.3. <i>Expresión de profilina fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP)</i>	44
6.5. Obtención de sueros policlonales anti-profilina	44
6.6. Inmuno blot	45
7. RESULTADOS	47
7.1. Expresión de profilina etiquetada en <i>T. cruzi</i>	47
7.2. Obtención de profilina para la inmunización de ratones	49
7.2.1. <i>Purificación de profilina de T. cruzi</i>	50
7.2.2. <i>Expresión de profilina recombinante en E. coli</i>	51
7.2.3. <i>Purificación de GST-profilina</i>	51
7.3. Caracterización de sueros policlonales anti-profilina	53
7.4. Expresión de profilina en <i>T. brucei</i> y <i>Leishmania major</i>	54
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIÓN	60
10. REFERENCIAS	61
11. ANEXOS	67
11.1. Construcción de vectores de expresión para <i>T. cruzi</i>	67
11.2. Construcción de vectores de expresión para <i>E. coli</i>	69

1. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figuras.

Figura 1. Componentes del citoesqueleto eucariota	16
Figura 2. Estructura de la actina	17
Figura 3. Estructura de la actina F	18
Figura 4. Actividades de las proteínas de unión a actina	20
Figura 5. Tipos de nucleadores de actina	21
Figura 6. Estructura profilina	22
Figura 7. Sitios de unión a ligandos en varias profilinas	24
Figura 8. Sitios de unión a profilina en varias actinas	25
Figura 9. Papel de profilina en la dinámica de polimerización de actina	28
Figura 10. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	31
Figura 11. Citoesqueleto de los tripanosomátidos	32
Figura 12. Modelo de la dinámica de actina en tripanosomátidos	34
Figura 13. Alineamiento múltiple de las profilinas de los tripanosomátidos	37
Figura 14. Vectores recombinantes para la expresión de profilina fusionada a mCherry en <i>T. cruzi</i>	39
Figura 15. Vectores recombinantes para la expresión de profilina en <i>E. coli</i>	43
Figura 16. Curvas de sensibilidad a G418 y de crecimiento de epimastigotes transfectados con vectores de expresión para <i>T. cruzi</i>	48
Figura 17. Caracterización de los parásitos transfectados con el vector pRiboTEX2-mCherry-profilina	49
Figura 18. Purificación de profilina por cromatografía de afinidad por poli-prolinas	50
Figura 19. Expresión de GST-profilina y MBP-profilina en <i>E. coli</i>	51
Figura 20. Purificación de profilina recombinante fusionada a GST	52
Figura 21. Reconocimiento de profilina de <i>T. cruzi</i> por sueros policlonales	54
Figura 22. Reconocimiento de profilinas recombinantes por sueros policlonales	54
Figura 23. Detección de profilina de <i>T. brucei</i> y <i>L. major</i>	55
Figura 24. Construcción de vectores recombinantes para la expresión de profilina fusionada a mCherry en <i>T. cruzi</i>	68

Figura 25. Construcción de vectores recombinantes para la expresión de profilina en *E. coli* _____ **70**

- Tablas.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la construcción de los vectores recombinantes pRiboTEX2-mCherry-Profilina y pRiboTEX2-mCherry _____ **39**

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la construcción de los vectores recombinantes pGEX4T1- profilina y pMALc2x-profilina _____ **43**

Tabla 3. Anticuerpos y diluciones utilizadas para los ensayos de inmuno blot _____ **46**

Tabla 4. Genes de profilina en tripanosomátidos _____ **55**

2. RESUMEN

El citoesqueleto de los tripanosomátidos está compuesto principalmente de microtúbulos. La presencia de microfilamentos de actina clásicos no ha sido demostrada. Sin embargo, se han identificado genes que codifican para actinas y para proteínas que en otros organismos regulan su dinámica de polimerización, entre los que encuentra profilina. Profilina es una proteína ubicua en los eucariotas que evita la polimerización espontánea de actina y mantiene una poza competente de monómeros para polimerizar. Estudios previos han demostrado la expresión del gen que codifica para profilina a nivel de RNA mensajero en *T. cruzi*. En el presente trabajo se abordaron diferentes estrategias para caracterizar a profilina a nivel de proteína en *T. cruzi*. Se transfectaron parásitos con vectores de expresión que codifican para profilina fusionada con la proteína roja fluorescente mCherry. En estos ensayos se obtuvieron parásitos recombinantes pero no se logró detectar la proteína de fusión. Por otro lado, se usaron dos metodologías para obtener el antígeno necesario para producir sueros policlonales anti-profilina en ratones: 1. Cromatografía de afinidad por poli-prolinas a partir de extractos de proteína de *T. cruzi*; 2. Expresión y purificación de profilina recombinante en *E. coli*. Con la segunda metodología se logró purificar la proteína suficiente para producir los sueros, que reconocen a profilina en extractos de proteína de tres tripanosomátidos: *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania major*. En conclusión, se demostró la expresión de profilina a nivel de proteína en tres especies de tripanosomátidos y se generaron herramientas moleculares (vectores de expresión, proteínas recombinantes y anticuerpos) que permitirán su caracterización en proyectos futuros.

3. ABSTRACT

The trypanosomatid cytoskeleton is composed mainly by microtubules. Classic actin filaments have not been detected. However, there are genes that encode for actins and also for proteins involved in the regulation of its polymerization dynamics, including profilin. Profilin is a ubiquitous protein that binds to the actin monomers and holds a pool of subunits suitable for polymerization. Previous works have demonstrated the presence of mRNA in two species of trypanosomatids: *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*. In the present work, different strategies for characterizing *T. cruzi*'s profilin were considered. Parasites were transfected with an expression vector that encode for a fusion of profilin with the red fluorescent protein mCherry. Recombinant parasites were obtained by using this strategy, but the expression of the fusion protein was not detected. On the other hand, two methodologies were used to obtain the antigen for producing polyclonal sera against profilin in mice: 1. Poly-proline affinity chromatography with *T. cruzi* protein extracts; 2. Expression and purification of recombinant profilin in *E. coli*. An enough amount of recombinant profilin for mice immunization was expressed and purified from *E. coli*. Polyclonal sera from mice immunized with the recombinant profilin, recognize a protein of the expected molecular weight of profilin (~16 kDa.) in *T. cruzi*, *T. brucei*, and *L. major* protein extracts. In conclusion, the expression of profilin at the protein level was demonstrated in three trypanosomatid species. Additionally, several molecular tools (expression vectors, recombinant proteins, and polyclonal antibodies) for characterizing *T. cruzi*'s profilin were generated.

4. INTRODUCCIÓN

El citoesqueleto es una red de proteínas filamentosas que juega un papel esencial en una gran variedad de procesos celulares como la locomoción, división celular, el transporte intracelular de vesículas y la organización de los contenidos celulares. La estructura, dinámica y composición del citoesqueleto ha sido estudiada en detalle en células de mamífero y en levadura. Sin embargo, el citoesqueleto de los organismos protistas difiere ampliamente si se le compara con el de estos organismos modelo. En los tripanosomátidos, un grupo de protistas flagelados parásitos que incluye a *Trypanosoma cruzi* (el agente causal de la enfermedad de Chagas en humanos), el citoesqueleto está constituido fundamentalmente de microtúbulos. Los microfilamentos de actina observados en estructuras como los lamelipodios y los anillos contráctiles no han sido detectados en estos organismos. A pesar de estos hallazgos, el análisis de la secuencia de sus genomas ha revelado la presencia de genes que codifican para actinas y para un repertorio de proteínas que en otros sistemas participan en regular su dinámica de polimerización (Berriman et al. 2005; DeMelo et al., 2008). En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar las actinas de *T. cruzi*, y las proteínas encargadas de la regulación de su polimerización. Profilina es una proteína que tiene un papel central en este aspecto ya que forma complejos 1:1 con los monómeros de actina, evitando su polimerización espontánea pero manteniendo una poza de actina competente para polimerizar (Dominguez, 2009). Se ha demostrado la expresión de profilina a nivel de RNA mensajero (mRNA) de profilina en *T. brucei* y la capacidad que tiene su gen codificador de complementar una mutante negativa de levadura para esta proteína, sugiriendo la expresión de un producto funcional (Wilson & Seebeck, 1997). Por esta razón, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio se decidió comenzar con la caracterización del gen ortólogo a profilina en *T. cruzi*, del cual se demostró su expresión a nivel de mRNA (Herrera-López 2008). En el presente trabajo, se demostró la expresión de profilina a nivel de proteína en *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*. Además, se generaron herramientas moleculares (proteínas recombinantes, anticuerpos y vectores de expresión) que permitirán caracterizar en detalle esta proteína en futuros proyectos.

4.1. Citoesqueleto eucariota.

Para que la célula realice todos los procesos necesarios para sobrevivir y reproducirse, las actividades de las miles de moléculas que la componen deben ser ordenadas y coordinadas de acuerdo a las condiciones de un entorno en constante cambio. El citoesqueleto juega un papel central en estos aspectos, al organizar espacialmente los contenidos celulares, conectar a la célula física y bioquímicamente con el ambiente externo y generar fuerzas coordinadas que le permiten a la célula moverse y cambiar su morfología (Fletcher & Mullins, 2010). El citoesqueleto de una célula eucariota "típica" está compuesto fundamentalmente de dos tipos de fibras proteicas llamadas microtúbulos y microfilamentos (Figura 1). Un tercer tipo de fibras, los filamentos intermedios, han sido descritos exclusivamente en metazoarios. Los microtúbulos y los microfilamentos están compuestos por proteínas altamente conservadas en la evolución: la tubulina y la actina, respectivamente.

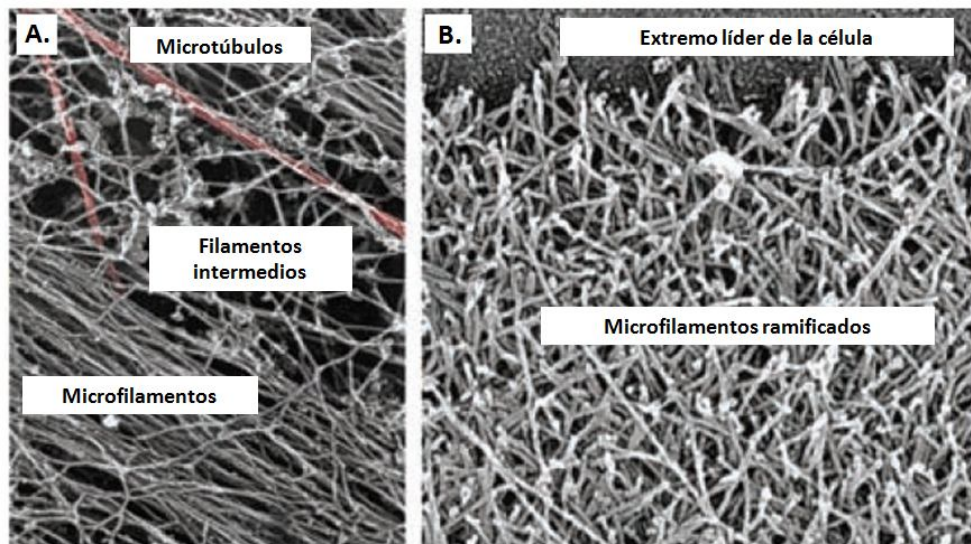


Figura 1. Micrografías electrónicas donde se muestran los componentes principales del citoesqueleto eucariota. (A) Célula mamífera donde se muestran microtúbulos (en rojo), redes de filamentos de actina y de filamentos intermedios (un tipo de fibra expresado exclusivamente por las células animales). (B) Red de filamentos de actina ramificados producidos en un queratocito en migración. Modificada de Pollard & Cooper (2009).

4.2. Actina.

Las actinas pertenecen a una superfamilia de proteínas que se caracteriza por unir una molécula de ATP. A este grupo también pertenecen las chaperonas HSP70, algunas clases de cinasas de azúcares y familias de proteínas de bacterias como MerB, FtsA y ParM (Wickstead & Gull, 2012). Las actinas se pueden dividir en tres grupos: las actinas

convencionales, las proteínas relacionadas con actina (ARPs) y las proteínas similares a actina (ALPs). Las actinas convencionales son las más similares en secuencia a las actinas α , β y γ de vertebrados. En cuanto las ARPs, se han descrito 11 subfamilias (ARP1 – 11), siendo ARP1 la más similar en secuencia a las actinas convencionales y ARP11 la más diferente (Muller et al., 2005). Algunos organismos poseen actinas adicionales que no se agrupan en ninguna de las clases anteriormente descritas. A éstas se les denomina proteínas similares a actina o actinas “huérfanas”. A pesar de la gran diversidad en secuencia y función que presentan las actinas, estas proteínas comparten la estructura terciaria pues se pliegan en dos dominios principales llamados dominios externo e interno (Figura 2). Cada dominio esta a su vez dividido en dos subdominios, el externo está comprendido por los subdominios 1 y 2 y el interno por los subdominios 3 y 4. Los dominios externo e interno están separados por una hendidura con actividad ATPasa a la cual se une una molécula de ATP y un catión divalente (Mg^{+2} en la célula). Una segunda hendidura está presente entre los dos dominios de la actina, la cual está compuesta principalmente por residuos hidrofóbicos y es el sitio de unión de la mayoría de las proteínas reguladoras de actina, entre ellas la profilina (Dominguez & Holmes, 2011).

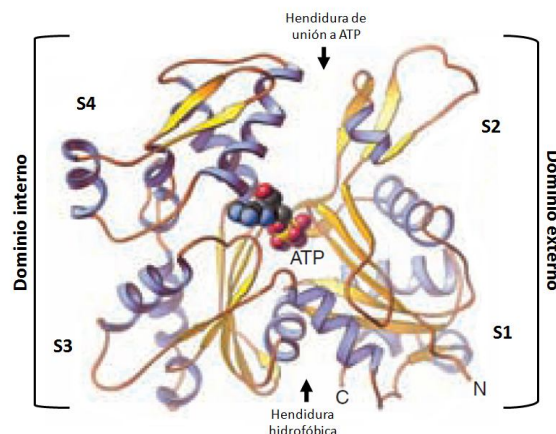


Figura 2. Estructura terciaria de la actina. Se muestran los dominios y subdominios (S1, S2, S3 y S4) de la actina, la hendidura de unión a ATP y la hendidura hidrofóbica por la cual actina interactúa con profilina y otras proteínas reguladoras. Modificada de Pollard & Cooper (2009).

Una propiedad de gran importancia para la función de las actinas es su capacidad de formar polímeros lineales, denominados actina filamentosa (actina F) o microfilamentos. La estructura de los microfilamentos ha sido determinada a partir patrones de difracción por rayos X, observaciones por microscopía electrónica y, más recientemente, por criomicroscopía electrónica. La primera estructura atómica fue deducida combinando patrones

de difracción de rayos X de filamentos producidos *in vitro* con la estructura cristalina de la actina monomérica (actina G) (Holmes et al., 1990). En este modelo cada microfilamento consiste de dos cadenas que forman una hélice que gira hacia la derecha. Usando criomicroscopía electrónica se logró obtener un modelo con mayor resolución, en el cual cada filamento es una hélice formada por una cadena que gira hacia la izquierda y posee ~ 13 subunidades cada seis giros (Dominguez & Holmes, 2011) (Figura 3A). Las subunidades de actina que componen el filamento interactúan entre sí a través de contactos longitudinales y transversales. Los dos contactos longitudinales principales involucran el subdominio 4 con el 3 y el subdominio 2 con la hendidura hidrofóbica (Figura 3B). Los dos contactos transversales principales involucran el subdominio 3 con el 2 y el subdominio 4 con la hendidura hidrofóbica (Figura 3C). Esta disposición se repite a lo largo de todo el filamento y, dada la asimetría de la molécula de actina, brinda al polímero polaridad. Al extremo que expone la hendidura hidrofóbica se le denomina extremo (-) o en punta, y al que expone la hendidura de unión a ATP se le denomina extremo (+) o bardado (Hild et al., 2010).

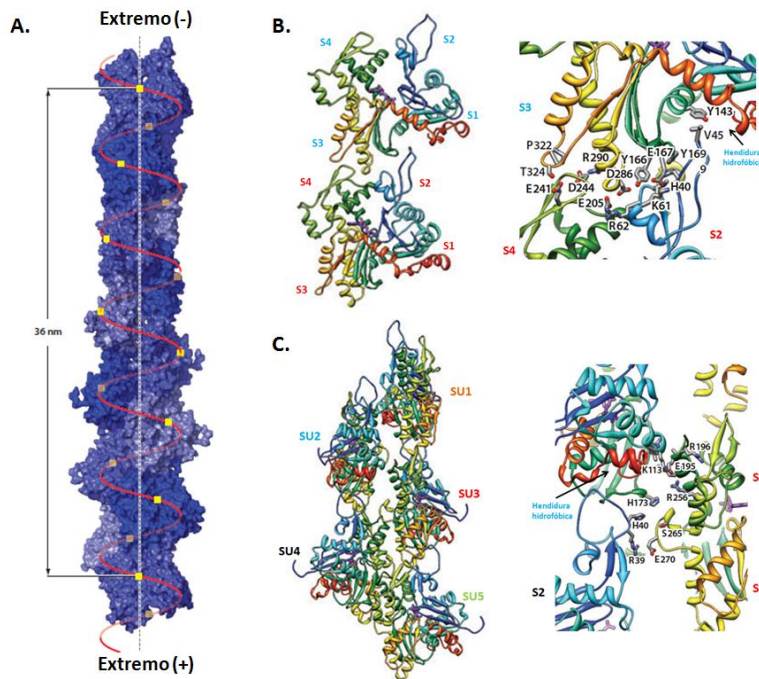


Figura 3. Estructura de la actina F. (A.) Modelo deducido a partir de criomicroscopía electrónica. Las moléculas de actina están dispuestas en una única hélice con 13 subunidades que se repiten cada ~6 giros (36 nm). Principales contactos longitudinales (B.) y transversales (C.) entre las subunidades. Se muestran las estructuras secundarias de cada subunidad en un código de colores del extremo amino (azul) al carboxilo (rojo), y los aminoácidos involucrados en los contactos. En (B.) se muestra una sección comprendida por la vista frontal de dos subunidades. En (C.) se muestra una sección comprendida por la vista lateral de cinco subunidades (SU). En (B. y C.) se señalan las posiciones de los subdominios (S) de cada subunidad en colores diferentes. Modificado de Dominguez & Holmes (2011).

4.2.1. Polimerización de actina.

En la célula, la actina puede encontrarse en dos estados principales: monomérico (actina G) y filamentosos (actina F). La mayoría de las funciones en las que la actina participa dependen de su capacidad de formar polímeros de manera regulada. Por esta razón, para entender cómo la actina participa en las funciones en donde está involucrada, es esencial estudiar su proceso de polimerización. La polimerización de la actina (transición del estado de actina G al de actina F) procede a través de tres pasos. Comienza por la formación de núcleos de actina (dímeros y trímeros) que sirven como semillas para el crecimiento del filamento. En el segundo paso, llamado elongación, el filamento crece producto de la asociación de monómeros de actina en sus dos extremos. En el último paso, llamado fase de estado estable, los monómeros se disocian por el extremo (-) y se reciclan para asociarse al extremo (+), resultando en un flujo unidireccional de subunidades de actina donde la longitud del filamento es más o menos constante (Dominguez, 2009). A este comportamiento se le llama *treadmilling*, por su semejanza a una banda sin fin. En ensayos *in vitro*, para que se presente la polimerización espontánea de actina y se mantenga la dinámica de polimerización en fase de estado estable se necesita de una concentración mínima de monómeros de actina, a la cual se le llama concentración crítica (Hild et al., 2010).

4.2.2. Proteínas reguladoras de la dinámica de polimerización de la actina.

Las funciones que lleva a cabo la actina en la célula se presentan en gran medida gracias a la interacción con una gran diversidad de proteínas, que en conjunto son llamadas proteínas de unión a actina (ABPs) (Fletcher & Mullins, 2010). Las ABPs pueden tener varias actividades, entre las que se encuentran formar y estabilizar núcleos de actina para la formación de microfilamentos (nucleadores), regular la dinámica de polimerización y despolimerización (moduladores de la polimerización), estabilizar a los microfilamentos o asociarlos con otros componentes celulares (organizadores supramoleculares), moverse sobre los microfilamentos y generar fuerza mecánica (motores), entre otras (Figura 4). A continuación se tratarán con más detalle algunas de las ABPs involucradas en regular la dinámica de polimerización de la actina.

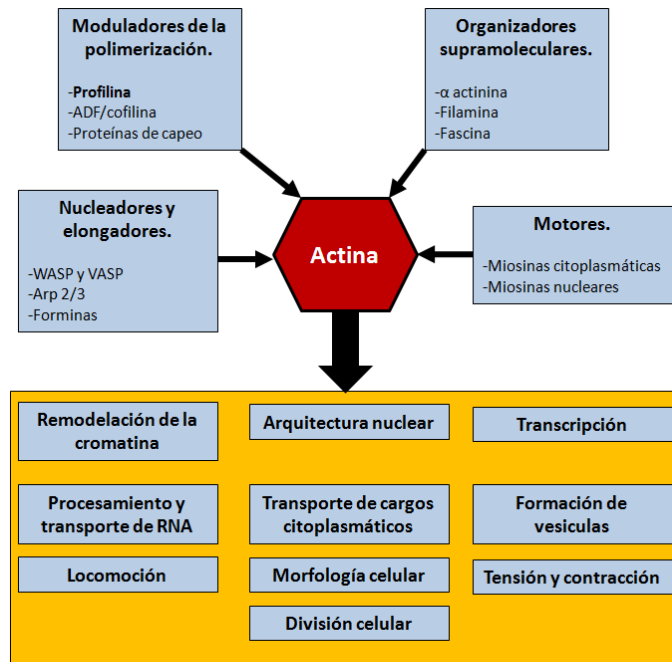


Figura 4. Actividades de algunas ABPs sobre el citoesqueleto de actina (recuadros azules). Funciones realizadas por el citoesqueleto de actina reguladas a través de la interacción con las ABPs (recuadro amarillo). Modificada de Schoenenberger et al. (2011).

4.2.2.1. Nucleadores y elongadores.

Para que se lleve a cabo de manera correcta la dinámica de polimerización de la actina, son necesarias proteínas que controlen el momento y sitio donde se presenta, así como el tipo de filamento que se genera. Las proteínas encargadas de estas funciones son los nucleadores y los elongadores. Los nucleadores son proteínas que se encargan de generar y estabilizar núcleos de actina que son usados para el proceso de polimerización. Los tres nucleadores más estudiados y distribuidos en la naturaleza son los basados en dominios WH-2 (con homología a la proteína del síndrome Wiskott–Aldrich (WASP)-2), el complejo Arp2/3 y las forminas (Dominguez, 2009). Los dominios WH-2 son una regiones cortas (25-50 aminoácidos) que se caracterizan por su capacidad de unir una molécula de actina G. Se encuentra en una gran cantidad de proteínas reguladoras de la polimerización de actina, entre ellas los nucleadores *Spire* y *Cordon-Bleu*. Estas proteínas poseen varias repeticiones de WH-2 dispuestas en tándem. Al unir de manera simultánea varios monómeros de actina, estas proteínas generan un núcleo de polimerización (Qualmann & Kessels, 2009) (Figura 5A). Arp2/3, por su parte, está compuesto por siete proteínas: dos proteínas relacionadas con actina (ARP2 y 3) y cinco subunidades adicionales (ARPC 1-5). Para ser funcional, Arp2/3 debe ser activado por factor promotor de la nucleación (NPFs).

Uno de los NPFs más estudiados es la proteína del síndrome Wiskott–Aldrich (WASP). WASP y otros NPFs, se unen de manera simultánea a Arp2/3 y a un monómero de actina a través de un dominio WH-2. Esta interacción promueve un cambio conformacional en Arp2/3 e incorpora un monómero de actina, que forma un núcleo de polimerización junto con ARP2 y ARP3 (Karlsson & Lindberg, 2007) (Figura 5B). Por último, las forminas son proteínas que se caracterizan por la presencia de un dominio FH-2 (con homología a forminas-2). Los dominios FH-2 de diferentes moléculas de forminas se unen en homodímeros, los cuales generan una estructura en forma de dona que estabiliza núcleos de actina (Goode & Eck, 2007) (Figura 5C).

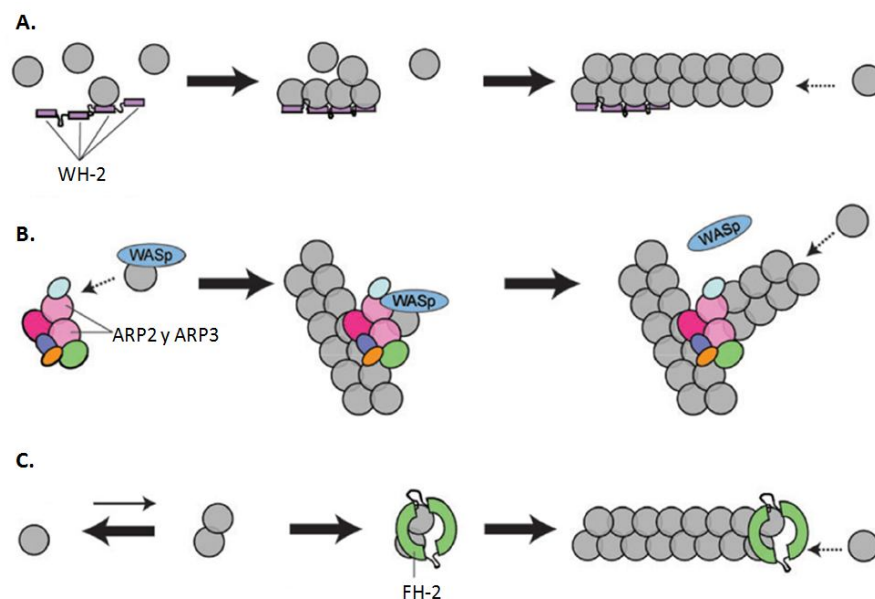


Figura 5. Tipos de nucleadores de actina. **(A.)** Proteínas nucleadoras con dominios WH-2. Cada dominio WH-2 se une a un monómero de actina generando un núcleo que es usado para formar un microfilamento **(B.)** Nucleación por Arp2/3. El complejo es activado por la unión de un NPF que posee unido un monómero de actina y forma un núcleo con ARP2 y ARP3. Este complejo se une lateralmente a un microfilamento pre-existente, formando una ramificación **(C.)** Nucleación por forminas. Homodímeros de dominios FH-2 estabilizan núcleos de actina que son usados para la formación de microfilamentos lineales. Modificado de Goode & Eck (2007).

Los elongadores son proteínas que facilitan la adición de monómeros de actina en los extremos (+) de los microfilamentos. Los dos elongadores mejor estudiados son las forminas y Ena/VASP (Fosfoproteína estimulada por vasodilatador). Las forminas son proteínas que, además de la actividad nucleadora descrita previamente, tienen la propiedad de permanecer unidas al extremo (+) de los microfilamentos en formación y promover la asociación de nuevos monómeros de actina. Esta actividad es facilitada por la presencia de

dominios adicionales. Entre éstos cabe destacar el dominio FH-1, que posee una región rica en prolinas a la cual se unen complejos profilina-actina, aumentando la concentración de actina-G disponible para polimerizar en los extremos (+) (Goode & Eck, 2007). Ena/VASP, por su parte, es un grupo de proteínas modulares que poseen dominios de interacción con actina G (GAB) y actina F (FAB), una región rica en prolinas y un dominio que permite la formación de tetrámeros de estas proteínas. Se ha propuesto un modelo para la elongación de los microfilamentos por Ena/VASP. En este modelo, tetrámeros de Ena/VASP se asocian con haces de microfilamentos (múltiples filamentos de actina dispuestos de manera paralela) a través de los dominios FAB. Allí, reclutan complejos de profilina-actina a través de la región rica en prolinas, transfieren los monómeros de actina a GAB y posteriormente a los extremos (+) de los microfilamentos (Lee & Dominguez, 2010).

4.2.2.2. Moduladores de la polimerización.

Actina es una de las proteínas más expresadas en las células eucariotas. A pesar de encontrarse en concentraciones superiores a la concentración crítica, en la célula no todas las moléculas de actina se encuentran en la forma estructural de actina F (Dominguez, 2009). Funciones como la locomoción celular y eventos de transporte intracelular mediados por el citoesqueleto de actina, requieren la polimerización rápida pero regulada de los microfilamentos. Para que esto ocurra, es necesario tener disponible una alta concentración de monómeros de actina competentes para polimerizar. Esta función es llevada a cabo por proteínas que se unen a la actina G y evitan su polimerización espontánea, regulando de esta forma la disponibilidad de los monómeros para el proceso de polimerización (Dos Remedios et al., 2003). Se han descrito varias proteínas con estas propiedades (>25 en mamíferos), pero sólo algunas se encuentran distribuidas en todos los eucariotas. Entre estas proteínas se encuentra profilina.

4.3. Profilina.

4.3.1. Estructura de profilina y ligandos.

Profilina forma una familia de proteínas que se encuentra distribuida en todas las células eucariotas. La única excepción conocida es *Giardia intestinalis* (Paredes et al., 2011), que carece de proteínas de unión a actina canónicas como las descritas con anterioridad. Una de las características de las profilinas es una baja conservación a nivel de secuencia de

aminoácidos. Incluso isoformas de profilina codificadas por el mismo organismo pueden tener niveles de similitud bajos. Ejemplos de ello son las profilinas 1 y 3 de mamífero, que sólo comparten el 37% de los aminoácidos (Witke, 2004). A pesar de esto, la capacidad que tienen profilinas de plantas y mamíferos de complementar mutantes negativas para profilina de la ameba *Dictyostelium discoideum* (Karakesisoglou et al., 1996; Schluter et al., 1998), sugiere que las profilinas codificadas por diferentes organismos poseen propiedades funcionales similares. La explicación de estas observaciones es la conservación de las profilinas a nivel estructural. Todas las profilinas con estructura terciaria conocida están constituidas por un centro de siete hojas β -plegadas dispuestas de manera antiparalela, las cuales están rodeadas por cuatro hélices α (Figura 6). Esta estructura forma dominios de interacción con tres tipos de ligandos: actina G, regiones ricas en prolina y lípidos de la membrana plasmática (Jockusch et al., 2007).

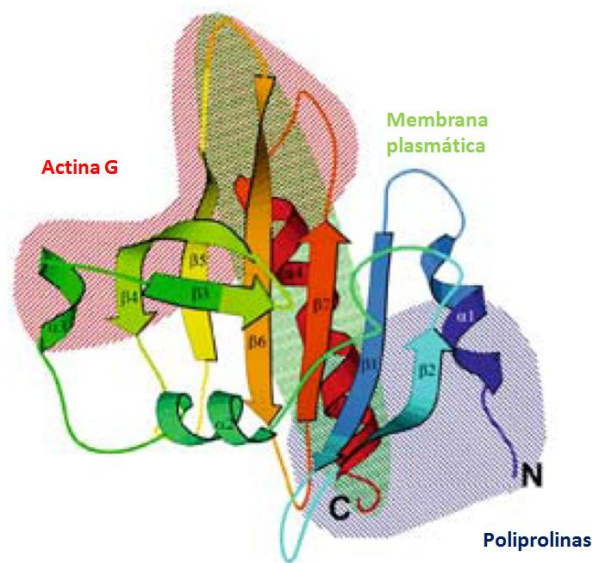


Figura 6. Representación esquemática de la estructura terciaria de la profilina bovina. Los elementos de la estructura secundaria se numeran de acuerdo a su posición en la secuencia de aminoácidos. Se muestran los sitios de unión a actina (rojo), a regiones ricas en prolina (azul) y a lípidos de la membrana plasmática (verde). Modificado de Jockusch et al. (2007).

4.3.1.1. Sitio de unión a actina G.

El sitio de profilina involucrado en la unión con actina fue identificado inicialmente a partir de la estructura cristalográfica del complejo actina-profilina de bovino (Shutt et al., 1993). El sitio está compuesto por 21 residuos que se encuentran en la hélice α 3 y las hojas β -plegadas 4, 5 y 6 (Figura 6). Sólo 8 de estos residuos se encuentran conservados en

profilinas de diferentes especies (Figura 7). A través de este sitio profilina interactúa con la actina G, con otras proteínas de la familia de las actinas como ARP2 (Machesky et al., 1994) y ARP3 (McCollum et al., 1996), y con al menos una proteína no relacionada con actina (Gieseemann et al., 2003). El sitio de unión a profilina en la actina se encuentra en la hendidura hidrofóbica (Figura 2) y, a diferencia de lo observado en profilina, está altamente conservado a nivel de secuencia (Figura 8). Este sitio se sobrepone, al menos parcialmente, con el de otras proteínas como la gelsolina, proteínas con dominios WH-2, ADF (Factor despolimerizador de la actina)/cofilina, timosina y con sitios de contacto subunidad-subunidad en la forma estructural actina F (Dominguez, 2004).

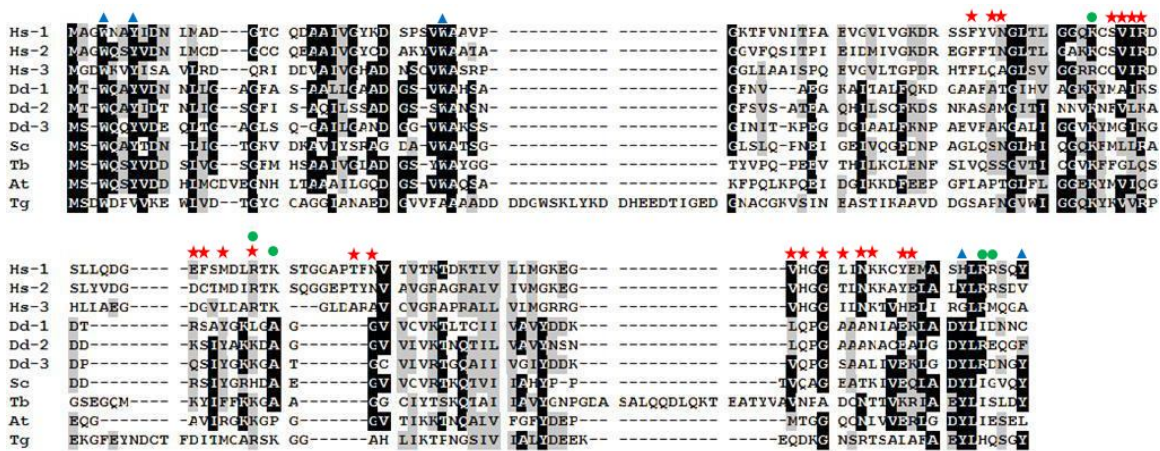


Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de varias profilinas. Se incluyen secuencias de 3 profilinas humanas (Hs), 3 de *Dictyostelium discoideum* (Dd), 1 de levadura (Sc), 1 de *Trypanosoma brucei* (Tb), 1 de *Arabidopsis thaliana* (At) y 1 de *Toxoplasma gondii* (Tg). Se indican con estrellas los residuos involucrados en la interacción con actina (estrellas rojas), poliprolinas (triángulos azules) y membrana (círculos verdes). Los residuos idénticos se señalan con recuadros negros y los conservados en grises. El alineamiento se realizó en el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y se visualizó en BioEdit (Hall, 1999). Los números de acceso en el GenBank de las secuencias usadas son los siguientes: Hs-1: AAH57828.1; Hs-2: AAH95444.1; Hs-3: EAW85006.1; Dd-1: CAA43781.1; Dd-2: P26200.1; Dd-3: Q8T8M2.1; Sc: AAA34861.1; Tb: CAA96531.1; At: AEC06923.1; Tg: AAX33672.1.

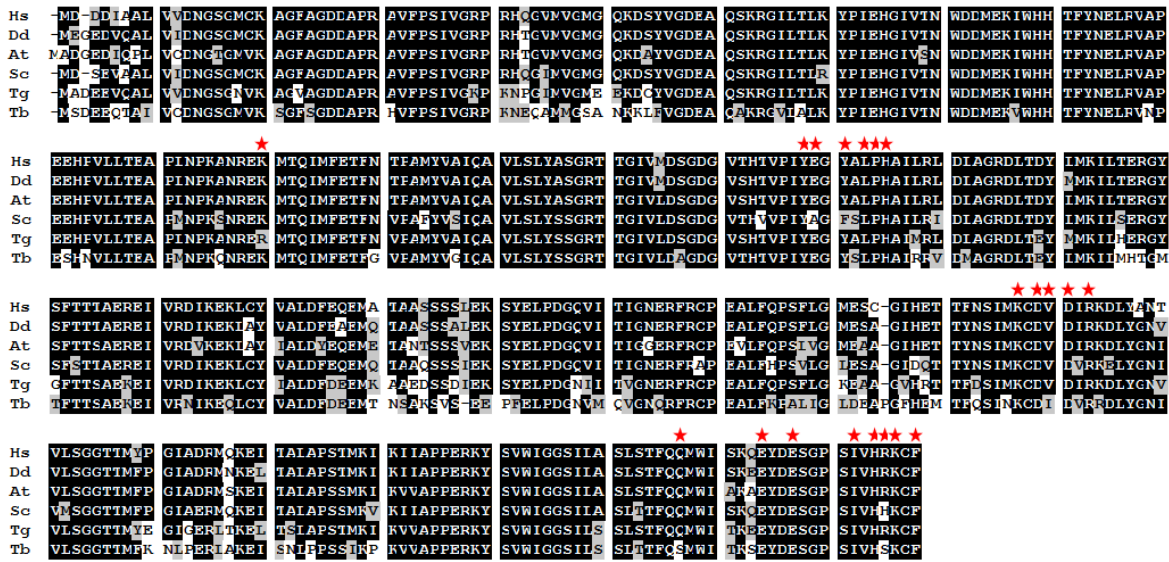


Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de varias actinas. Se incluyen secuencias de humano (Hs), *Dictyostelium discoideum* (Dd), levadura (Sc), *Trypanosoma brucei* (Tb), *Arabidopsis thaliana* (At) y *Toxoplasma gondii* (Tg). Se indican con estrellas los residuos involucrados en la interacción con profilina. Los residuos idénticos se señalan con recuadros negros y los conservados en grises. El alineamiento se realizó en el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y se visualizó en BioEdit (Hall, 1999). Los números de acceso en el GenBank de las secuencias usadas son los siguientes: Hs: NP_001092.1; Dd: XP_636030.1; At: NP_187818.1; Sc: AAA34391.1; Tg: EEB02523.1; Tb: AAA30151.1.

4.3.1.2. Sitio de unión a poli-prolinas.

El sitio de unión a poliprolinas está formado por las hélices α que se encuentran en los extremos amino y carboxilo de profilina (Figura 6). Los residuos directamente involucrados en esta interacción han sido identificados en la estructura cristalina de complejos de profilina de mamífero con péptidos de prolinas (Mahoney et al., 1997). Estos residuos son aromáticos (W3, Y6, W31, H133 y Y139 en la profilina humana) y se encuentran altamente conservados en otras profilinas (Figura 7). Se ha demostrado que *in vitro* se requiere de una región de por lo menos 10 prolinas consecutivas para que se presente una unión eficiente entre profilina y péptidos de prolinas sintéticos (Perelroizen et al., 1994). Sin embargo, esto no puede ser extrapolado a los ligandos de profilina en la célula. Otros aminoácidos, particularmente las glicinas y aminoácidos hidrofóbicos, pueden estar presentes junto a las prolinas en los ligandos que interactúan con profilina a través de esta región (Reinhard et al., 1995; Chang et al., 1997). Además, se ha demostrado que la afinidad de profilina por regiones ricas en prolina es regulada por eventos de fosforilación y desfosforilación en el residuo serina-137 de la profilina humana (Shao et al., 2008; Shao & Diamond, 2012) y se ha sugerido que eventos de fosforilación en residuos de tirosina tienen un papel similar en

profilinas de plantas (Aparicio-Fabre et al., 2006). Aunque la mayoría de los ligandos que interactúan con profilina a través de regiones ricas en prolinas corresponden a proteínas involucradas en la dinámica de polimerización de la actina (Jockush et al., 2007), se han identificado al menos dos ligandos sin conexión aparente con el citoesqueleto de actina, el factor transcripcional p42^{POP} (Lederer et al., 2005) y la proteína de sobrevivencia de las neuronas motoras (SMN) (Giesemann et al., 1999), que está involucrada en el procesamiento de RNA.

4.3.1.3. Sitio de unión a lípidos de la membrana plasmática.

La interacción de profilina con la membrana plasmática se presenta a través de diferentes tipos de fosfatidil-inositoles (PIP), principalmente el fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP₂). La unión de profilina con PIP involucra interacciones electrostáticas entre la cabeza cargada negativamente del PIP y regiones ricas en aminoácidos básicos de profilina (Krishnan & Moens, 2009). En las profilinas, se han descrito dos regiones de unión a PIP que se sobrepone parcialmente con los sitios de unión a actina (Sohn et al., 1995) y a poliprolinas (Lambrechts et al., 2002). Tomando como referencia la secuencia de la profilina humana, el primer sitio está compuesto por los residuos K69, R88 y K90 y el segundo por los residuos R135 y R136 (Figura 7). Con excepción de K69 y R88, estos residuos se encuentran pobremente conservados en otras profilinas. Se han propuesto dos papeles no excluyentes para la interacción de profilina con PIPs en la célula (Krishnan & Moens, 2009): 1. Regular el metabolismo de PIPs; 2. Secuestrar a profilina en la membrana plasmática, evitando su interacción con actina y otras proteínas.

4.3.2. Profilina en la célula.

4.3.2.1. Isoformas.

En los genomas eucariotas, profilina puede ser codificada por genes de copia única o por familias génicas que producen varias isoformas (Radauer & Breiteneder, 2007). El primer escenario se presenta en algunos organismos unicelulares como los tripanosomátidos (Wilson & Seebeck, 1997; Herrera-López, 2008), los apicomplexos (Kursula et al., 2008) y las levaduras (Lu & Pollard, 2001), así como en algunos invertebrados como *Drosophila melanogaster* (Soderberg et al., 2012). El segundo escenario se presenta, por ejemplo, en amibas (Makioka et al., 2012; Kaiser et al., 1986; Haugwitz et al. 1991), vertebrados y

plantas, siendo estos dos últimos casos los mejor caracterizados. En vertebrados se han identificado 5 isoformas de profilina, de las cuales cuatro están codificadas por genes diferentes y una es producto de *splicing* alternativo. Una de las isoformas es expresada en todos los tejidos (profilina 1) y las otras son exclusivas de cerebro (profilina 2a y 2b), y de testículo y riñón (profilinas 3 y 4) (Krishnan & Moens, 2009). Una situación similar se ha encontrado en *Arabidopsis*, donde se expresan 5 isoformas de profilina, de las cuales tres (profilinas 1-3) son constitutivas y dos (profilinas 4 y 5) se expresan exclusivamente en el polen (Kandasamy et al., 2002).

4.3.2.2. Localización subcelular.

Profilina se distribuye en varias zonas donde se presentan funciones relacionadas con la dinámica de actina. Ejemplo de ello es la co-localización de profilina con el sistema de microfilamentos encargado de la motilidad celular en diferentes líneas celulares mamíferas y en la ameba *Entamoeba invadens* (Mayboroda et al., 1997; Makioka et al., 2012). Es interesante mencionar que isoformas de profilina expresadas en una misma célula pueden exhibir patrones de distribución subcelular diferentes. En *Arabidopsis*, por ejemplo, la expresión de fusiones de dos isoformas de profilina con la proteína verde fluorescente (GFP) sugiere que la profilina 1 co-localiza principalmente con la red de microfilamentos, mientras que la profilina 2 se encuentra asociada con la maquinaria de transporte intracelular de vesículas (Wang et al., 2009). De manera similar, estudios de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra las profilinas 1 y 2 de mamífero en neuronas de ratón, sugieren localizaciones subcelulares diferentes de estas dos isoformas (Jockusch et al., 2007). Aunque gran parte de la información sobre las actividades de profilina en la célula conciernen a la regulación del citoesqueleto de actina en el citoplasma, la profilina también se encuentra en el interior del núcleo co-localizándose con partículas intranucleares como los cuerpos de Cajal y los *speckles* nucleares (Skare et al., 2003).

4.3.2.3. Actividades citoplasmáticas y nucleares de profilina.

Inicialmente, la profilina fue identificada en extractos de proteína de bazo de bovino como una proteína que formaba complejos 1:1 con la actina G e inhibía la polimerización. De esta actividad se derivó su nombre, al mantener a la actina en una forma "profilamentosa" (Carlsson et al., 1977). Además de impedir la polimerización espontánea, se han descrito

otras actividades de profilina sobre la dinámica de polimerización de la actina. En presencia de nucleadores de la polimerización, como Arp2/3 y las forminas, profilina promueve la adición de monómeros de actina a los extremos (+) libres de los microfilamentos (Figura 9). Esto lo realiza al interactuar de manera simultánea con actina y con regiones ricas en prolina presentes en los factores promotores de la nucleación que activan a Arp2/3 y en los dominios FH1 de las forminas, incrementando la concentración de monómeros de actina en los extremos (+). Por otro lado, algunas profilinas también pueden generar monómeros de actina propicios para ser añadidos en los extremos (+) libres de los microfilamentos. Esta actividad la realiza al promover un cambio conformacional en los monómeros de actina unidos a ADP que son liberados de los extremos (-) de los microfilamentos, lo que favorece el intercambio de este nucleótido por una molécula de ATP. Este intercambio produce moléculas de actina-ATP (Porta & Borgstahl, 2012), que son el sustrato favorecido durante el proceso de polimerización (Dominguez & Holmes, 2011).

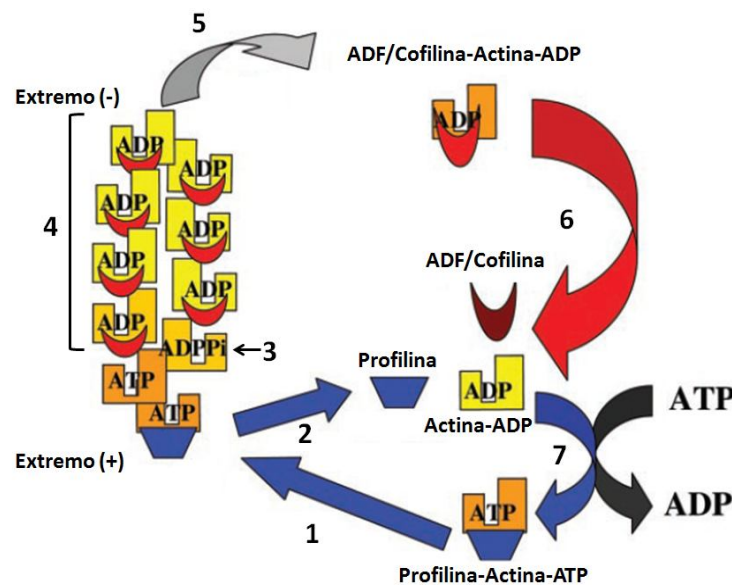


Figura 9. Reguladores básicos de la dinámica de polimerización de actina. 1. Incorporación de profilina-actina-ATP al extremo (+) 2. Disociación de profilina de actina-ATP; 3. Hidrólisis de ATP por actina; 4. Unión de ADF/cofilina a las subunidades de actina-ADP; 5. Despolimerización de complejos ADF/cofilina-actina-ADP; 6. Disociación de ADF/cofilina de actina-ADP; 7. Unión de profilina a monómeros de actina-ADP e intercambio de ADP por ATP. Modificada de Dos Remedios et al. (2003).

Además de las actividades citoplasmáticas mencionadas, en los últimos años se ha reunido cada vez más evidencia de la presencia y función de profilina en el núcleo celular. Por ejemplo, profilina ha sido descrita como un co-factor esencial para regular la cantidad de

actina en el núcleo a través de un transportador específico para complejos profilina:actina, la exportina 6 (Stuven et al., 2003). Esta actividad mantiene la actina en el núcleo por debajo de la concentración crítica, evitando la formación de polímeros de actina que podrían tener consecuencias nocivas en la estructura y función nuclear. Las actividades de profilina en el interior del núcleo no solo están relacionadas con actina. Se ha demostrado que su interacción con la proteína p42^{POP} regula negativamente la actividad de este factor de transcripción (Lederer et al., 2005). Además, profilina se ha co-localizado con partículas intranucleares involucradas en el *splicing* de RNA y se ha demostrado por ensayos *in vitro* que anticuerpos contra profilina inhiben este proceso (Skare et al., 2003). Más recientemente, usando anticuerpos contra la profilina del insecto *Chrinomus tentans*, se determinó que la fracción nuclear de esta proteína es excluida de regiones de cromatina densa y se co-localiza con proteínas marcadoras de genes transcripcionalmente activos (Soderberg et al., 2012). Los estudios mencionados sugieren que profilina está involucrada en una gran diversidad de funciones relacionadas con la expresión génica, las cuales aun no han sido exploradas.

4.4. *Trypanosoma cruzi*.

4.4.1. Importancia biomédica.

T. cruzi es un parásito protista flagelado responsable de ocasionar la enfermedad de Chagas. El rango endémico de esta enfermedad incluye todos los países de Suramérica y Centroamérica. Sin embargo, las migraciones de personas han ampliado su distribución a Estados Unidos, Canadá, Japón, Australia y varios países de Europa (Kirchhoff, 2011). Se estima que 10 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* y que cerca de 10000 muertes ocurren anualmente a causa de este parásito (WHO, 2010). Durante el curso de la enfermedad de Chagas se presentan dos etapas, una aguda y una crónica. La etapa aguda comienza de 1 a 2 semanas después del primer contacto con el parásito y tiene una duración de 4 a 8 semanas. Durante esta etapa, gran parte de las personas infectadas no muestran síntomas específicos. En una minoría de pacientes se detecta inflamación en el sitio de inoculación de los parásitos, lesiones que se conocen como chagomas. La etapa crónica puede durar todo el tiempo de vida del individuo. Las manifestaciones clínicas más importantes son las alteraciones cardíacas, aunque también se pueden presentar complicaciones gastrointestinales y del sistema nervioso central. A la fecha, sólo existen

dos medicamentos licenciados con eficacia limitada contra la enfermedad. Estos son el nifurtimox y el benznidazol, ambos efectivos primordialmente durante la etapa aguda y con varios efectos secundarios adversos (Bern et al., 2011).

En adición a su importancia médica, *T. cruzi* y otras especies de tripanosomátidos han sido usadas como modelos biológicos para describir procesos celulares y moleculares que difieren ampliamente de los establecidos a partir de estudios en organismos modelo como las células mamíferas y las levaduras. Entre ellos cabe mencionar la organización de los genes en unidades de transcripción policistrónicas (Martínez-Calvillo et al., 2010) y la composición del citoesqueleto en base de microtúbulos, con ausencia de microfilamentos clásicos (Gull, 1999). Además, *T. cruzi* ofrece varias ventajas desde el punto de vista experimental, como por ejemplo: 1. Se pueden obtener varios de los estadios del ciclo de vida del parásito en cultivo; 2. Existen vectores y protocolos de transfección disponibles para la manipulación genética del parásito; 3. Se ha liberado la secuencia de su genoma, lo que permite la identificación y análisis de genes usando herramientas bioinformáticas.

4.4.2. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *T. cruzi* comienza cuando un insecto triatomino se alimenta de la sangre de un hospedero mamífero infectado con formas extracelulares y no replicativas del parásito llamadas tripomastigotes sanguíneos (Figura 10). En el interior del intestino del insecto, los tripomastigotes se transforman a epimastigotes, un estadio con capacidad replicativa. Los epimastigotes migran hacia el intestino posterior del insecto, donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos, una forma no replicativa pero con capacidad de infectar células mamíferas. Cuando un insecto infectado se alimenta de un mamífero, excreta tripomastigotes metacíclicos que al entrar en contacto con áreas vulnerables como la mordedura del insecto, las conjuntivas o las mucosas orales o nasales, pueden infectarlo. Una vez en el mamífero, los tripomastigotes metacíclicos invaden células y se transforman en amastigotes, una forma intracelular y replicativa. Después de varias rondas de replicación, los amastigotes se transforman en tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados por la ruptura celular. Los tripomastigotes sanguíneos liberados pueden infectar nuevas células o llegar al torrente sanguíneo, donde son llevados a otros órganos. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino se alimenta de los tripomastigotes sanguíneos circulantes del mamífero infectado (Tyler & Engman 2001).

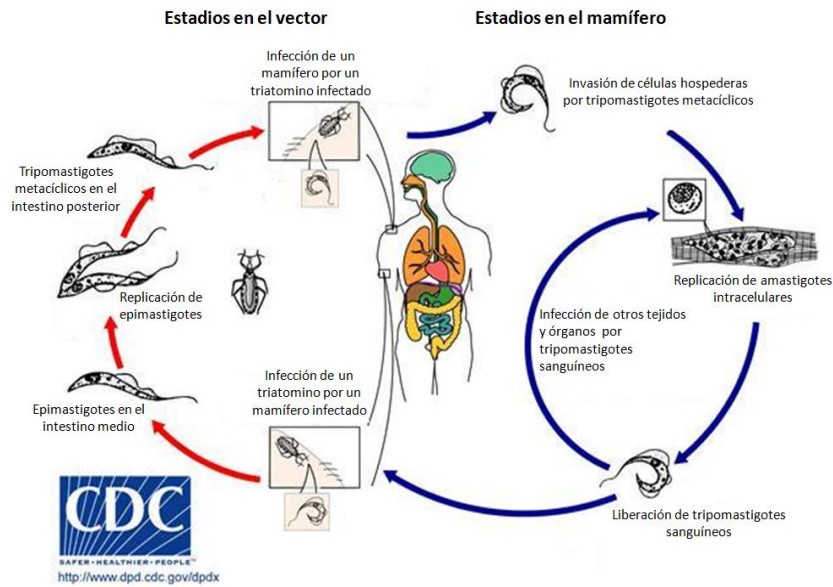


Figura 10. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Modificada de: www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html.

Se han descrito otros mecanismos de transmisión de *T. cruzi* que no están representados en el ciclo de vida descrito anteriormente. Entre ellos cabe mencionar ciclos de transmisión selvática que involucran mamíferos que se alimentan de triatomíneos o de mamíferos infectados y la transmisión congénita. En humanos, aunque la principal causa de infección es a través de la mordedura de triatomíneos en áreas endémicas, las transfusiones de sangre, la donación de órganos, la transmisión congénita, la ingesta de bebidas o alimentos contaminados y los accidentes de laboratorio también se han descrito como fuentes de transmisión del parásito (Kirchhoff, 2011).

4.4.3. Citoesqueleto.

El citoesqueleto de los tripanosomátidos se caracteriza por estar constituido principalmente de microtúbulos, los cuales forman parte central de estructuras como el corsé subpelicular, el flagelo y los cuerpos basales (Figura 11). El corsé subpelicular es una red de microtúbulos que se encuentran adosados a la cara interna de la membrana plasmática, alineándose de la parte anterior a la posterior del parásito con la misma polaridad, brindando forma y resistencia mecánica a la célula (Figura 11A). El flagelo, por su parte, emerge de una invaginación de la membrana plasmática libre de microtúbulos llamada bolsillo flagelar y se dirige hacia la parte anterior de la célula anclado por un sistema de filamentos que se denomina zona de anclaje flagelar (Figura 11B). Además de un axonema con un arreglo de microtúbulos 9+2 típico, el flagelo de los tripanosomátidos posee una

estructura adicional, llamada barra paraflagelar, que recorre el flagelo en paralelo con el axonema. El flagelo y sus estructuras asociadas han sido implicados en una gran variedad de funciones, entre las que se encuentran la motilidad, la citocinesis, la endocitosis y la adhesión celular. Además de estas estructuras, en cada parásito se encuentra un cuerpo basal asociado con el flagelo y el cinetoplasto, una masa de DNA mitocondrial que es característica de los tripanosomátidos y de otros protistas del grupo taxonómico al que pertenecen (Kinetoplastidae). Los cuerpos basales participan como centros organizadores de microtúbulos durante la biogénesis del flagelo (Gull, 1999).

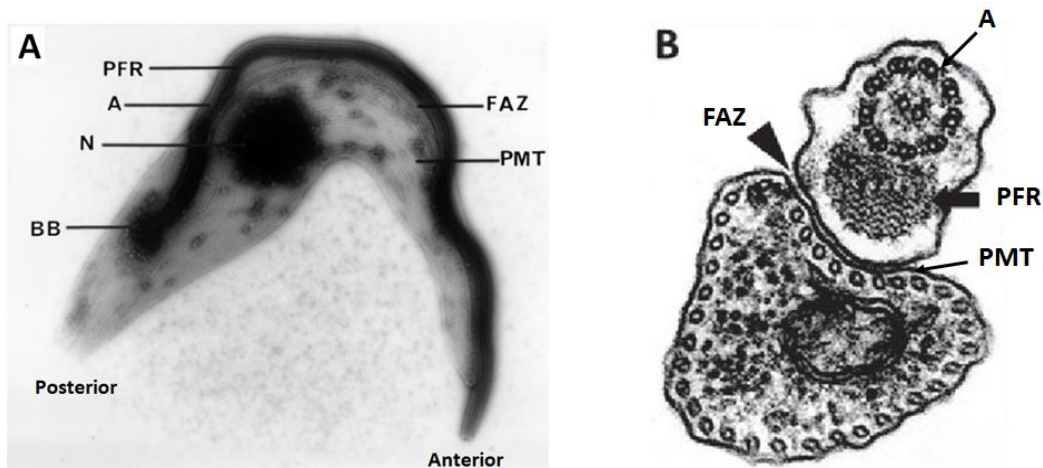


Figura 11. Citoesqueleto de los tripanosomátidos tomando como modelo tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*. (A.) Micrografía electrónica de una vista lateral de un citoesqueleto extraído con detergente. (B.) Micrografía electrónica de una sección transversal donde se observa el corsé subpelicular y el flagelo. Las estructuras señaladas son las siguientes: Cuerpos basales (BB), núcleo (N), axonema (A), barra paraflagelar (PFR), zona de anclaje flagelar (FAZ) y corsé subpelicular (PMT). Tomadas de: Gull (1999) y Portman & Gull (2012).

4.4.4. Actina.

La actina de los tripanosomátidos presenta varias características que han dificultado su estudio: 1. Las posibles estructuras celulares formadas por los polímeros de actina no han sido detectadas por microscopia electrónica (Gull, 1999); 2. Las formas poliméricas de actina no son estabilizadas por faloidina, ni disociadas latrunculina B o citocalasina D (Sahasrabudde et al., 2004), toxinas usualmente utilizadas para su estudio; 3. Anticuerpos heterólogos la reconocen débilmente (Mortara et al., 1989), lo que dificulta su uso en estudios de localización subcelular; y 4. Su forma nativa no puede ser purificada por cromatografía de afinidad por DNasa I, ya que una débilmente esta proteína (Mortara et al., 1989; Kapoor et al., 2008). Aunque las funciones de las actinas y de sus proteínas

reguladoras están lejos de ser comprendidas en los tripanosomátidos, gracias a los proyectos genoma en los últimos años la identificación bioinformática de genes codificadores para actinas y para proteínas de unión a actina, el desarrollo de anticuerpos homólogos y enfoques de genética reversa han permitido comenzar su caracterización en *T. brucei*, *Leishmania donovani* y *T. cruzi*. En *T. brucei*, anticuerpos anti-actina han encontrado una distribución diferencial de esta proteína en los diferentes estadios del ciclo de vida de este parásito. En los tripomastigotes sanguíneos actina se co-localiza con la maquinaria endocítica presente en el bolsillo flagelar, mientras que en las formas procíclicas se distribuye de manera homogénea en toda la célula. De manera similar, la disminución de la expresión de la actina por RNA de interferencia tiene un efecto diferente en estos dos estadios, siendo esencial para la endocitosis y la sobrevivencia de las formas sanguíneas pero no de las procíclicas (García-Salcedo et al., 2004). En los promastigotes de *Leishmania*, actina se localiza en el flagelo, el bolsillo flagelar, el núcleo, el corsé subpelicular y el cinetoplasto (Sahasrabudde et al., 2004), donde está involucrado en el remodelamiento del DNA mitocondrial (Kapoor et al., 2010). En nuestro laboratorio, se demostró que actina es expresada en niveles similares pero en diferentes localizaciones subcelulares en tres de los estadios (epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos y amastigotes) del ciclo de vida de *T. cruzi*. Además, análisis en geles en 2-D muestran que se expresan varias isoformas de actina en los diferentes estadios del ciclo de vida (Cevallos et al., 2011).

4.4.5. Profilina y otras proteínas reguladoras de la dinámica de actina.

El análisis de la secuencia de los tres primeros genomas de tripanosomátidos liberados (*T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*; también conocidos como "TriTryps") reveló la presencia de genes homólogos que en otros organismos codifican para proteínas involucradas en la nucleación de microfilamentos (forminas y los componentes del complejo Arp2/3), en la modulación de la dinámica de polimerización de la actina (ADF/cofilina, CapZ, AIP1 y profilina) y de proteínas responsables de la formación de haces de microfilamentos y de vincular los microfilamentos con los microtúbulos (coronina y End-binding protein-1 (EB1)) (Berriman et al., 2005; DeMelo et al., 2008). Con los datos del genoma, se ha propuesto un modelo que explica la dinámica de polimerización de actina en los tripanosomátidos (Figura 12) (DeMelo et al., 2008). Sin embargo, este modelo asume la conservación funcional de las proteínas involucradas, supuesto que no necesariamente se

cumple para todas las proteínas. Además, la expresión de solo dos de los genes identificados por bioinformática que posiblemente están involucrados en regular la dinámica de polimerización de la actina, ha sido corroborada experimentalmente (profilina y ADF/cofilina), y solo para uno de ellos (ADF/cofilina) existen datos de caracterización bioquímica y funcional.

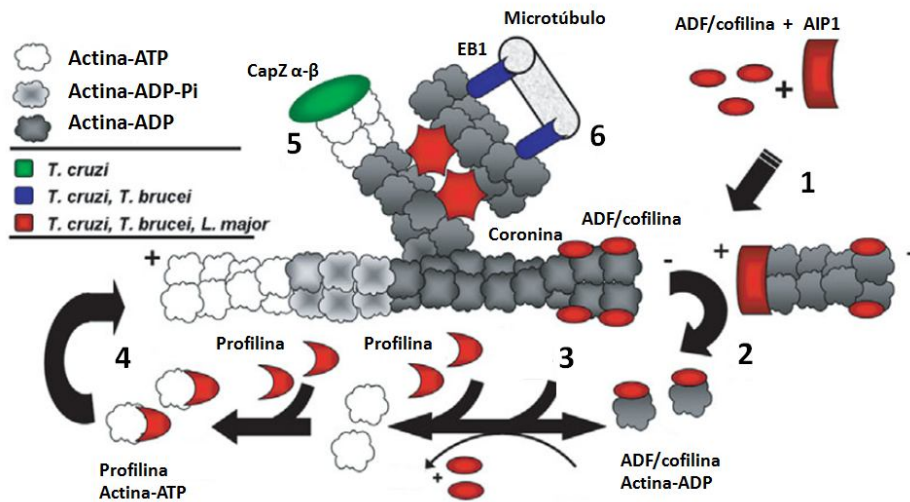


Figura 12. Modelo de la dinámica de actina en tripanosomátidos. 1. ADF/cofilina se asocia con filamentos compuestos por actina-ADP en los extremos (-) y los corta o disocia. AIP1 se une al extremo (+) generado evitando la adición de monómeros; 2. Acumulación de monómeros de actina-ADP unidos a ADF/cofilina; 3. Liberación de ADF/cofilina y unión de profilina a los monómeros; 4. Profilina promueve el intercambio de ADP por ATP en los monómeros de actina y su adición en los extremos (+); 5. CapZ α - β se une los extremos (+) y restringe la polimerización y longitud del filamento; 6. Coronina y EB1 actúan para formar haces de microfilamentos y vincular el citoesqueleto de actina con el de tubulina. Modificado de: DeMelo et al. (2008).

- *ADF/cofilina*: Un gen homólogo a ADF/cofilina ha sido caracterizado en *Leishmania donovani*. Canónicamente, ADF/cofilina posee dos actividades: 1. Incrementar su despolimerización por los extremos (-); 2. Cortar los microfilamentos. Ensayos *in vitro* muestran que el homólogo de *L. donovani* conserva la actividad de despolimerizar los microfilamentos de actina y, en menor medida, de cortarlos. Además, contrario a otras ADF/cofilinas y similar a las profilinas de mamífero y de levadura, esta proteína promueve el intercambio de ADP por ATP en los monómeros de actina, promoviendo de esta forma su reciclaje (Tammana et al., 2008). La función de esta proteína ha sido analizada por enfoques de genética reversa. Mutantes de *L. donovani* en los que se suprimió la expresión de ADF/cofilina muestran defectos en el ensamble del flagelo (Tammana et al., 2008). Además, estas mutantes crecen más lentamente en comparación con las células silvestres,

tienen una capacidad reducida de duplicar el bolsillo flagelar durante la división celular y fallas en el tráfico intracelular de vesículas (Tamma et al, 2010). Existe evidencia que estos fenotipos están asociados con alteraciones en la dinámica de polimerización de la actina. Por ejemplo, en las mutantes negativas para ADF/cofilina la localización y el estado de actina cambia. Mientras que en las células silvestres actina se observa principalmente como parches y gránulos en todo el cuerpo celular, en las mutantes se encuentra en forma filamentosa (Tamma et al., 2008). Además, la sobreexpresión de una versión de ADF/cofilina incapaz de regular la dinámica de actina *in vitro*, genera parásitos con características fenotípicas similares a las mutantes negativas (Kumar et al., 2012).

5. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

La presencia y expresión a nivel de RNA mensajero de un gen codificador de profilina en los tripanosomátidos fue inicialmente demostrada en *T. brucei* (Wilson & Seebeck, 1997). Cuando se comparó la secuencia deducida de aminoácidos de este gen con la de otras profilinas se identificó una inserción de 19 aminoácidos cercana al extremo carboxilo (Wilson & Seebeck, 1997), la cual se encuentra conservada en profilinas de otros tripanosomátidos (Figura 13A). A pesar de la presencia de esta inserción y del bajo nivel de similitud que posee con otras profilinas (>30%), el gen de profilina de *T. brucei* complementa una mutante negativa para profilina de levadura, lo que sugiere la expresión de un producto funcional (Wilson & Seebeck, 1997). Además, un modelo computacional de la estructura terciaria de la profilina de *T. cruzi* realizado en una tesis de maestría de nuestro laboratorio (Herrera-López, 2008), sugiere que el plegamiento de la proteína esta conservado con respecto al de estructuras de profilina determinadas experimentalmente (Figura 13B). En esta tesis también se demostró la expresión a nivel de RNA mensajero del gen codificante para profilina en los epimastigotes de *T. cruzi* y se clonó un fragmento genómico con la secuencia codificante de profilina en un vector diseñado para la expresión de proteínas fusionadas a una etiqueta de His(x6) en *E. coli*, con el fin de purificar proteína recombinante para la obtención de anticuerpos policlonales que permitieran la caracterización de profilina. A pesar de que la integridad de la secuencia codificadora se verificó por secuenciación, no se logró expresar la proteína recombinante en cantidades detectables en *E. coli*.

A.

Tb	MSWCSYVDD	SLVSGSF	MHSAALVGLA	DGSYWAYGC	-----	-----	YVFC-P	BEVPHIKKCL	ENFSIVQSSG	VIIIGVKRFFG	
Tc	MSWCAVDD	SLIGSGH	MHSAALVGLS	DGSYWAYGC	-----	-----	YVFC-P	BEVAHIKCL	GNFSIVQSSG	VIIIGVKRFFG	
Lm	MSWCAVDD	SLIGSGN	MHSAALVGLA	DGSYWAYGC	-----	-----	YVFC-P	BEVCHIKKCL	SEFSIVQSSG	VIIIGVKRFFG	
Sc	MSWCAVDD	SLIGSGN	VDRVAVYSPA	GLVVAWATSC	-----	-----	GLSTC-P	NEIGEVGGF	LFAGLQSNQ	LFIQGGREML	
At	MSWCSYVDD	KIMCEVEGNH	LTPAAHIGQ	DGSVVAQSA	-----	-----	KFPQLKP	CEIDGIRKDF	EEFPGFIAPTG	LFIQGGREML	
Tg	MSLWDFVVK	WIVDTLY	CCAGGIANA	DGVVFAAAD	DDDGWSKLYK	DDHEEDTIGE	DGNACGRVSI	NEASTIRAAV	DD--GSAFNG	VVIIGGRYKV	
Tb	LQSCSECCM	-----	KYIF	KKGAAGGCY	TSKQTALAV	YGNP	DASAL	QDILCRTEAT	YVAVNFADCN	TIVKRIAEYL	ISLDY
Tc	LQSCSECCM	-----	KYIF	KKGAAGGCY	TSKQTALAV	YGNP	ETSSSL	QDILCRKEGA	EIAVNFADCN	STVKRIAEYL	ISLDY
Lm	LQCTTQDC	-----	KYIF	KKGAAGGCY	TRKCAFVAV	YGNP	ETSSSL	QDILCRNTAH	AVTVNFADCN	TIVKRIADYL	IRIGY
Sc	LRADD	-----	RSIYG	RHLAEGVVCV	RTKQTVLAAH	HP	-----	-----	IVGAGEAT	KIVEQLADYL	IGVCF
At	LCGEQG	-----	AVIRG	RKPGGVVTK	KINCAIVFGF	YDFP	-----	-----	MTGGCN	IVVERLGDYL	ISESL
Tg	VRPEKGFYN	DCTFDITMCA	RSKGGAHLIK	TFNGSIVIAL	YDEEK	-----	-----	EQDKNSR	TSALAFAEYL	HQSGY	

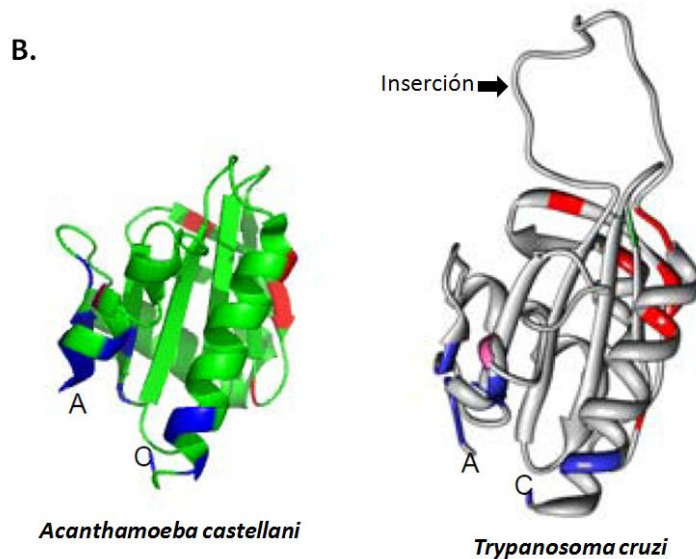


Figura 13. (A.) Alineamiento múltiple de las profilinas de los TriTryps donde se señala la inserción de 19 aminoácidos conservada presente en estas proteínas (recuadro rojo). Se incluyen secuencias de *T. brucei* (Tc), *T. cruzi* (Tc), *L. major* (Lm), levadura (Sc), *Arabidopsis thaliana* (At) y *Toxoplasma gondii* (Tg). Los residuos idénticos se señalan con recuadros negros y los conservados en grises. El alineamiento se realizó en el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y se visualizó en BioEdit (Hall, 1999). Los números de acceso en el GenBank de las secuencias usadas son los siguientes: Tb: CAA96531.1; Tc: EAN85652.1; Lm: XP_001685367; Sc: AAA34861.1; At: AEC06923.1; Tg: AAX33672.1. **(B.)** Modelo computacional de la estructura terciaria de la profilina de *T. cruzi*. Se indica la posición de la inserción de 19 aminoácidos, la cual no logró ser estructurada por el programa utilizado. El modelo se compara con la estructura de la profilina de *Acanthamoeba castellanii*. Se señalan los sitios de interacción con actina (rojo), poli-prolinas (azul) y membrana (rosa). Figura 13B tomada de Herrera-López (2008).

Preguntas centrales en la biología celular y molecular actuales son: ¿Qué hacen las proteínas en la célula?, ¿Dónde están localizadas? y ¿Cómo se comportan y regulan? (Crivat & Taraska, 2012). El primer paso para abordar estas preguntas es generar las herramientas moleculares necesarias. Dos de las herramientas más valiosas y ampliamente utilizadas son la expresión de fusiones etiquetadas con proteínas fluorescentes (Crivat & Taraska, 2012) y la generación de anticuerpos específicos contra la proteína bajo estudio (Cooper & Paterson, 2009). Estas herramientas facilitan, por ejemplo, la detección y visualización de las proteínas en la célula, la identificación de proteínas que interactúan con ellas y la caracterización bioquímica de la proteína. Con el objetivo de iniciar la caracterización de profilina a nivel de proteína en *T. cruzi* se decidió utilizar ambas estrategias, es decir, la expresión de profilina como fusión a una proteína fluorescente y la producción de anticuerpos policlonales.

6. METOLOGÍA

6.1. Obtención de parásitos.

Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa CL Brener obtenidos en el medio de cultivo *Liver Infusion Tryptose* (LIT) complementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL y hemina 25 µg/mL a una temperatura de 28°C (Camargo, 1964). El número de células se determinó en cámara de Neubauer. Los promastigotes procíclicos de *T. brucei* y *L. major* fueron amablemente proporcionados por el laboratorio del Dr. Santiago Martínez Calvillo.

6.2. Generación de transfectantes estables de *T. cruzi*.

Se clonó la secuencia codificante de profilina fusionada a la proteína roja fluorescente mCherry en el vector pRiboTEX2, una versión del vector de expresión para *T. cruzi* pRiboTEX construido en nuestro laboratorio (Martínez-Calvillo et al. 1997). Este vector contiene un promotor de transcripción que es reconocido por la RNA polimerasa I, las señales necesarias para la generación de RNA mensajero maduro y un gen que confiere resistencia a geneticina G418. Con el vector recombinante se transfectaron parásitos para estudiar la localización subcelular de la proteína de fusión.

6.2.1. Construcción de vectores para la expresión de mCherry-profilina en *T. cruzi*.

La secuencia codificante de profilina fue amplificada por PCR (94°C x 4 min, [94°C x 30 s, 60°C x 20 s, 72°C x 20 s] x 30 ciclos, 72°C x 10 min) a partir de una clona genómica de *T. cruzi* construida en nuestro laboratorio (Herrera-López, 2008), usando oligonucleótidos que poseen sitios de restricción para *Bgl* II y *Eco* RI (Tabla 1). El producto de PCR fue clonado en pGEM-T Easy (Promega) y el plásmido recombinante fue digerido con *Bgl* II y *Eco* RI. El fragmento de DNA con la secuencia de profilina fue purificada de gel de agarosa y clonada en el vector pmCherry-C1 en fase con la secuencia codificante para la proteína mCherry (ClonTech). La secuencia codificante para la proteína de fusión mCherry-profilina de pmCherry recombinante, fue amplificada por PCR (94°C x 4 min, [94°C x 30 s, 58°C x 30 s, 72°C x 45 s] x 30 ciclos, 72°C x 10 min) con oligonucleótidos que poseen sitios de restricción para *Bam* HI y *Eco* RI. El fragmento de DNA con la secuencia codificante para mCherry-profilina digerido por los sitios de *Bam* HI y *Eco* RI

fue obtenido como se describió anteriormente y se clonó en el vector pRiboTEX2 (Figura 14). Adicionalmente, se clonó la secuencia codificante para mCherry en pRiboTEX2 con el fin de usar el vector recombinante como control de localización subcelular (Figura 14). Este vector se construyó siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito. Los oligonucleótidos para PCR (94°C x 4 min, [94°C x 30 s, 55°C x 30 s, 72°C x 40 s] x 30 ciclos, 72°C x 10 min) usados para clonar mCherry contienen los sitios de restricción para *Bam* HI y *Eco* RI y, además, un codón de parada en el oligonucleótido reverso (Tabla 1). Todas las clonaciones se realizaron con la DNA ligasa T4 de *E. coli* siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega). Los insertos de los plásmidos fueron confirmados por secuenciación.

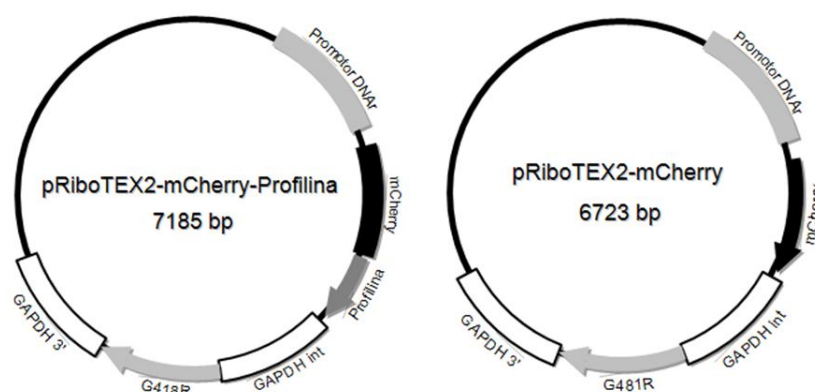


Figura 14. Vectores recombinantes para la expresión de profilina fusionada a mCherry en *T. cruzi*. Se muestran las principales características de los vectores: Secuencias codificantes de mCherry-profilina y mCherry, gen de resistencia a G418 (G418R), promotor transcripcional del DNA ribosomal y secuencias con las señales para el procesamiento del RNA mensajero (GAPDH int y GAPDH 3’).

Nom-bre	Secuencia	Dirección	Uso
JFO1	<i>AGATCT</i> TCGTGGCAGGCGTATATCG	D	Clonación de profilina en pmCherry-C1. Posee un sitio de corte para <i>Bgl</i> II
JFO2	<i>GAAATC</i> TTAGTAATCCAAACTGATAAG	R	Clonación de profilina en pmCherry-C1 y de mCherry-profilina en pRiboTEX2. Posee un sitio de corte para <i>Eco</i> RI
JFO3	<i>GGATCC</i> ATGGTGAGCAAGGGCGAGG	D	Clonación de mCherry-profilina y mCherry en pRiboTEX2. Posee un sitio de corte para <i>Bam</i> HI
JFO4	<i>GAAATC</i> TTA CTTGTACAGCTCGTCCATGC	R	Clonación de mCherry en pRiboTEX2. Posee un codón de parada y un sitio de corte para <i>Eco</i> RI.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la construcción de los vectores recombinantes pRiboTEX2-mCherry-Profilina y pRiboTEX2-mCherry. Los sitios de corte para las enzimas de restricción se indican en cursiva y los codones de parada en negrita.

6.2.2. Transfección de epimastigotes y selección de parásitos recombinantes.

Con los vectores pRiboTEX2-mCherry-Profilina y pRiboTEX2-mCherry, se transfectaron 40×10^6 epimastigotes en fase media logarítmica de crecimiento por electroporación. Para la electroporación, los parásitos se resuspendieron en 400 μ L de solución de Zimmerman (NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, acetato de magnesio 0.5mM, acetato de calcio 90 μ M; pH 7.0) fría y se transfirieron a cubetas de electroporación. Se agregaron 100 μ g de DNA plasmídico superenrollado resuspendido en 50 μ L de amortiguador TE (Tris 10 mM pH7.4 y EDTA 1mM). Como controles, se electroporaron parásitos con la misma cantidad de DNA del vector vacío (pRiboTEX2) y con amortiguador TE. Se transfirieron las cubetas de electroporación con las células y el material a electroporar a hielo durante 5 minutos, se llevaron al electroporador y se les proporcionó un único pulso eléctrico usando las condiciones optimizadas por Lu & Buck (1991): 360 V, 1500 μ F y 13 Ω . Las células electroporadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se transfirieron a frascos de cultivo de 25 mL con 10 mL de medio LIT. Por último, se determinó la densidad celular de los parásitos sobrevivientes por conteo en cámara de Neubauer. Para la selección de los parásitos recombinantes, se agregó a los cultivos geneticina G418 (Sigma) a una concentración de 400 μ g/mL 24 horas después de la electroporación. Se realizó seguimiento del crecimiento de los cultivos por conteo en cámara de Neubauer.

6.2.3. Caracterización de parásitos recombinantes.

Para detectar la presencia de los genes codificantes para mCherry y mCherry-profilina, se realizaron PCRs a partir de lisados celulares de los parásitos transfectados. Los lisados se prepararon por cuatro rondas de congelamiento (hielo seco) y descongelamiento (temperatura ambiente) de los parásitos resuspendidos en agua. Para amplificar a mCherry se usaron los oligonucleótidos JFO3 y JFO4 (Tabla 1), y para mCherry-profilina JFO3 y JFO2. Como control de las reacciones se amplificó el gen codificante de profilina con los oligonucleótidos JFO1 y JFO2 (Tabla 1). Las PCRs se realizaron usando las siguientes condiciones: 94°C x 4 min, [94°C x 30 s, 58°C x 40 s, 72°C x 45 s] x 30 ciclos, 72°C x 5 min. Para detectar la expresión de las proteínas de fusión en los parásitos transfectados, se realizaron ensayos de inmuno blot y observaciones por microscopía de fluorescencia. Los inmuno blot se realizaron usando un anticuerpo comercial anti-mCherry usando las condiciones que se describen en la sección 6.5.2. Para la microscopía de fluorescencia, los

parásitos fueron cosechados del medio de cultivo por centrifugación (2500g por 10 minutos a 4°C) y lavados en dos ocasiones con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM; pH 7.4). Posteriormente, se fijaron sobre portaobjetos silanizados (Sigma) con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% durante 30 minutos. Finalmente, se montaron las muestras con el medio para microscopia de fluorescencia Vectashield (Vector laboratories) con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir el DNA y se analizaron en el microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

6.3. Obtención de la profilina nativa de *T. cruzi* por cromatografía de afinidad.

Este procedimiento se realizó en base a un protocolo desarrollado en el laboratorio del Dr. Federico Sánchez para la purificación de profilina de plantas (Vidali et al., 1995).

*6.3.1. Obtención de extractos de proteína de *T. cruzi*.*

Se cosecharon por centrifugación (2500 g por 10 minutos a 4°C) ~ 2x10⁹ epimastigotes cultivados en medio LIT, se resuspendieron en 20 mL de amortiguador de extracción de proteínas (Tris 10 mM pH 8.0, KCl 100 mM, Gly 100 mM, DTT 1mM) y se lisaron por sonicación. Posteriormente, se centrifugó el lisado celular (15000 g por 20 minutos a 4°C) y se recuperó la fracción soluble de proteínas (sobrenadante). La fracción insoluble (pellet) se resuspendió en 20 mL amortiguador de extracción de proteínas con Tritón X-100 a una concentración final del 1% para solubilizar componentes asociados a membranas, y se centrifugó como se describió anteriormente. De esta manera, se obtuvo un extracto de proteínas enriquecido en proteínas citosólicas y uno enriquecido en proteínas asociadas a membrana.

6.3.2. Cromatografía de afinidad por poli-prolinas.

Se utilizaron columnas con una matriz (Affi-Gel 10, BioRad) acopada a poli-prolinas previamente preparadas en el laboratorio del Dr. Federico Sánchez. Los extractos de proteína de *T. cruzi* obtenidos como se describió anteriormente, se pasaron tres veces por las columnas de afinidad. Posteriormente, las columnas fueron lavadas con 400 mL de amortiguador de extracción de proteínas. Por último, se realizaron tres eluciones con 100 mL de los siguientes amortiguadores: 1. Tris 10 mM pH 8, KCl 1 M; 2. Tris 10 mM pH

8, Urea 3 M; 3. Tris 10 mM pH 8, Urea 8 M. Las proteínas eluidas fueron concentradas por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 15% toda la noche a 4°C, centrifugadas, resuspendidas en amortiguador de carga desnaturizante para proteínas y visualizadas en geles de SDS-PAGE.

6.4. Expresión y purificación de profilina recombinante.

6.4.1. Construcción de vectores para la expresión de profilina recombinante en E. coli.

Se clonó la secuencia codificante de profilina en dos vectores (pGEX4T1 y pMALc2x) para la expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*. El vector pGEX4T1 (Amersham Biosciences) está diseñado para expresar proteínas fusionadas con la glutatión S- transferasa (GST) y el vector pMALc2x (New England Biolabs) para proteínas fusionadas con la proteína de unión a maltosa (MBP), ambos en el extremo amino de las proteínas recombinantes. En los dos casos, la secuencia codificante de profilina fue clonada en los sitios para las enzimas de restricción *Bam* HI y *Sal* I en fase con la etiqueta correspondiente (Figura 15). Las clonaciones se realizaron de la siguiente manera: 1. Se amplificó por PCR la secuencia codificante de profilina a partir de una clona genómica de *T. cruzi* construida en nuestro laboratorio (Herrera-López, 2008). La PCR (94°C x 4 min, [94°C x 30 s, 60°C x 20 s, 72°C x 20 s] x 30 ciclos, 72°C x 10 min) se realizó con oligonucleótidos que poseen sitios de restricción *Bam* HI y *Sal* I (Tabla 2); 2. El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega); 3. El plásmido pGEM-T Easy recombinante fue digerido con las enzimas *Bam* HI y *Sal* I; 4. Se purificó de gel de agarosa el fragmento de DNA codificante de profilina digerido; 5. Se clonó el fragmento de DNA purificado en los vectores de expresión. Las clonaciones se realizaron con la DNA ligasa T4 de *E. coli* siguiendo las recomendaciones del fabricante (Promega). Los insertos de todos los plásmidos fueron confirmados por secuenciación.

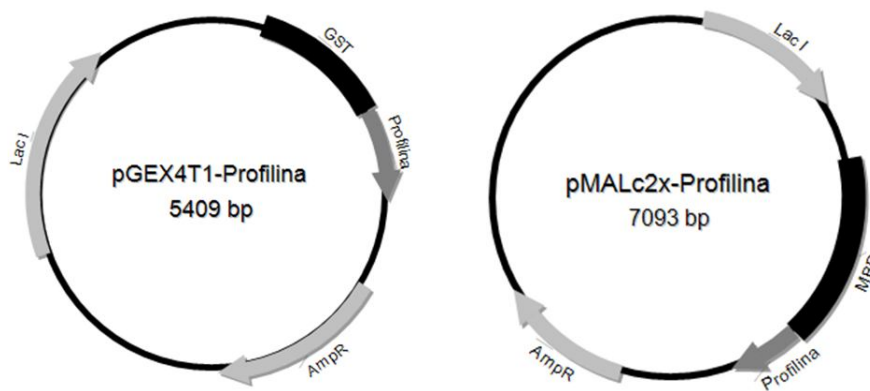


Figura 15. Vectores para la expresión de profilina recombinante en *E. coli*. Se muestran las principales características de los vectores: Secuencias codificantes para profilina fusionada a GST y MBP, gen de resistencia a ampicilina (AmpR) y gen codificante para la proteína represora *Lac I*.

Nombre	Secuencia	Dirección	Uso
Prof-Bam-F	<i>GGATCC</i> ATGTCGTGGCAGGCGTAT	D	Clonación de profilina en pGEX-4T1 y pMAL-c2x. Posee un sitio de corte para <i>Bam</i> HI.
Prof-Sal-R	<i>GTCGAC</i> TTAGTAATCCAAACTGATAAG	R	Clonación de profilina en pGEX-4T1 y pMAL-c2x. Posee un sitio de corte para <i>Sal</i> I.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la construcción de los vectores recombinantes pGEX4T1-Profilina y pMALc2x-Profilina. Los sitios de corte para las enzimas de restricción se indican en cursiva.

6.4.2. Expresión y purificación de profilina fusionada a la glutatión *S*-transferasa (GST).

Se transformaron células de *E. coli* de la cepa BL-21 con 100 ng del vector recombinante que codifica para profilina fusionada a GST. Se crecieron clones recombinantes en medio Luria Bertani (LB) con ampicilina 100 µg/mL a 37°C con agitación, se indujo la expresión de la proteína recombinante con isopropil-β-D-galactosidasa (IPTG) 1mM durante dos horas y se evaluó la presencia de la proteína de fusión por SDS-PAGE e inmuno blot con un anticuerpo comercial anti-GST (sección 6.6.). Una vez detectada la proteína de fusión, se realizaron ensayos de solubilidad de la proteína recombinante para descartar que se estuviera expresando en cuerpos de inclusión. Para estos ensayos, se indujeron cultivos de bacterias usando las condiciones descritas anteriormente. Se cosecharon las bacterias por centrifugación (3000 g por 10 minutos a 4°C) y se lisaron en una solución hipotónica (Tris 20mM pH8, EDTA 1mM) con lisozima 100 µg/mL durante 30 minutos a temperatura

ambiente y por sonicación (8 - 10 pulsos de 10 segundos a 20 mA). Posteriormente, se llevó el lisado de proteínas a PBS y Tritón X-100 al 1%. Los lisados de bacterias se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron (10000g por 20 minutos a 4°C) para separar las fracciones soluble (sobrenadante) y no soluble (pellet) de proteína. Con fracciones solubles de proteína, se realizó la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad usando glutatión inmovilizado en una matriz de sefarosa (GE Healthcare). Para este procedimiento, se obtuvieron lisados de bacterias inducidos solubles en PBS-Tritón X-100 y se incubaron con un volumen apropiado de la matriz glutatión-sefarosa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, la glutatión-sefarosa se cosechó por centrifugación (500g por 5 minutos) y se lavó tres veces con 10 volúmenes de PBS. Por último, se liberó la proteína recombinante incubando 3 – 5 veces la glutatión-sefarosa con un volumen de amortiguador de elución (Tris-HCl 50mM, glutatión reducido 10mM, pH 8.0). Las eluciones obtenidas se unieron en un solo tubo y se concentró la proteína purificada ultrafiltrando dos veces con un dispositivo Amicon Ultra-15 (Millipore) con un corte de 30 kDa. La concentración de proteína obtenida se estimó por ensayos de Bradford (BioRad) estándar.

6.4.3. Expresión de profilina fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP).

Se transformaron células de *E. coli* de la cepa BL-21 con 100 ng del vector recombinante que codifica para profilina fusionada a MBP. La inducción, visualización y solubilización de la proteína recombinante se realizó con el mismo protocolo usado para GST-profilina. La detección de la etiqueta MBP en la proteína inducida se realizó por ensayos de inmuno blot con un anticuerpo anti-MBP comercial (sección 6.6.). Para determinar si la proteína inducida se unía a una matriz de amilosa (New England BioLabs), utilizada para purificar proteínas fusionadas a MBP por cromatografía de afinidad, se incubaron las fracciones solubles de proteína de *E. coli* con cantidades apropiadas de la matriz de afinidad (se ajustó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La matriz de afinidad se cosechó por centrifugación (500g por 5 minutos) y se lavó en tres ocasiones con 10 volúmenes de PBS. Por último, se resuspendió la matriz en 1 volumen de amortiguador de carga denaturalizante para proteínas, se calentó a 94 °C durante 5 minutos y se visualizó en un gel de SDS-PAGE.

6.5. Obtención de sueros policlonales anti-profilina

Para la obtención de sueros policlonales anti-profilina, se inmunizaron 10 ratones Balb/c machos de 6 semanas de edad con GST-profilina recombinante purificada como se describió anteriormente. Dos semanas antes de comenzar el esquema de inmunización, se tomaron muestras de sangre de todos los ratones para obtener los sueros pre-inmunes. La primera inmunización se llevó a cabo intraperitonealmente con 10 µg de antígeno (GST-profilina) resuspendidos en 100 µL de PBS. Esta proteína fue emulsificada en un volumen de adyuvante completo de Freund. A cada ratón se le suministraron dos refuerzos con la misma dosis de antígeno 7 y 14 semanas después de la primera inmunización. En estos refuerzos el antígeno fue emulsificado en adyuvante incompleto de Freund. Los sueros inmunes se obtuvieron dos semanas después del segundo refuerzo. Para la obtención de los sueros, se incubó la sangre durante 3 horas a 4°C, se centrifugó (18000 g por 20 minutos a 4°C) y se recuperaron los sobrenadantes (sueros). Los animales fueron manipulados con un protocolo aprobado por la comisión de bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los procesos de inmunización, sangrado y sacrificio de los animales se realizaron por personal capacitado del bioterio.

6.6. Inmuno blot.

La detección de profilina recombinante en extractos de proteína de *E. coli* y de profilina en extractos de proteína de tripanosomátidos se realizó mediante ensayos de inmuno blot. Para realizar estos ensayos, los extractos de proteína fueron separados en geles de SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa (BioRad) en cámara húmeda a 150 mA por 2-3 horas a 4°C. Posteriormente, se bloquearon las membranas con una solución de leche descremada al 5% en PBS y Tritón X-100 al 0.05% toda la noche a 4°C. Después, se agregaron los anticuerpos primarios a la dilución adecuada (Tabla 3) en una solución de leche descremada al 2% en PBS y Tritón X-100 al 0.05% y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Para remover el exceso de anticuerpo, se lavaron las membranas tres veces durante cinco minutos con agitación fuerte con una solución de PBS y Tritón X-100 al 0.05%. Por último, se agregaron los anticuerpos secundarios adecuados en la dilución apropiada (Tabla 3), se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y se lavó como se describió anteriormente. Las reacciones quimioluminiscentes se llevaron a cabo con el sustrato Super Signal (Pierce) y se revelaron manualmente en placas autoradiográficas (Amersham Pharmacia).

Proteína detectada	Anticuerpo primario	Anticuerpo Secundario	Uso
GST	Anti-GST policlonal (ThermoScientific). Dilución: 1:5000.	Anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Pierce). Dilución: 1:75000	Detección de GST en proteínas fusionadas a esta etiqueta en <i>E. coli</i> .
MBP	Anti-MBP policlonal (Pierce). Dilución: 1:5000	Anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Pierce). Dilución: 1:75000	Detección de MBP en proteínas fusionadas a esta etiqueta en <i>E. coli</i> .
α -Tubulina	Anti- α -Tubulina monoclonal (Amersham). Dilución: 1:30000	Anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Pierce). Dilución: 1:30000	Control positivo de los ensayos de inmuno blot de <i>T. cruzi</i> .
Profilina	Sueros policlonales anti GST-profilina. Dilución: - 1:1000 (sueros 1 y 2) - 1:2000 (sueros 3-10)	Anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Pierce). Dilución: 1:30000	Detección de profilina en <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> y <i>L. major</i> .
mCherry	Anti-mCherry monoclonal (Clontech) Dilución: 1:2000	Anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Pierce). Dilución: 1:30000	Detección de mCherry-profilina en epimastigotes recombinantes.

Tabla 3. Anticuerpos y diluciones utilizadas para los ensayos de inmuno blot.

7. RESULTADOS

7.1. Expresión de profilina etiquetada en *T. cruzi*.

La expresión de proteínas fusionadas a una proteína fluorescente ha sido una estrategia exitosa para visualizar *in vivo* la localización subcelular de proteínas (Crivat & Taraska, 2012). Una de las estrategias abordadas para caracterizar a la profilina de *T. cruzi* fue expresar esta proteína fusionada a la proteína roja fluorescente mCherry. Para ello, se clonó la secuencia codificante de profilina fusionada a mCherry (mCherry-profilina) en el vector pRiboTEX2, el cual está diseñado para la expresión de proteínas en *T. cruzi*. Por otro lado, se clonó la secuencia de mCherry en el vector de expresión mencionado para utilizarlo como control de localización subcelular. De esta manera, se generaron los vectores recombinantes pRiboTEX2-mCherry-profilina y pRiboTEX2-mCherry. La integridad de los insertos presentes (mCherry-profilina y mCherry) en ambos vectores fue confirmada por secuenciación (Anexo 10.1). Se realizaron dos intentos de transfección y selección de las transfectantes estables con estos vectores, usando como controles de transfección y de selección de las transfectantes estables parásitos electroporados sin DNA y con el vector vacío (pRiboTEX2). En el primer intento, el control de selección (parásitos electroporados sin DNA) no presentó el comportamiento esperado, ya que creció en presencia de una concentración del antibiótico G418 (250 µg/mL) previamente usada en la literatura (Martínez-Calvillo et al., 1997) para la selección de las transfectantes estables de *T. cruzi* usando el gen de resistencia presente en pRiboTEX2 (Neomicina). Por esta razón, se realizó una curva de crecimiento de parásitos con diferentes concentraciones del antibiótico para determinar una dosis a la cual la cepa de *T. cruzi* de nuestro laboratorio mostrara sensibilidad a G418 (Figura 16A). Los parásitos fueron sensibles al antibiótico a partir de una concentración de 400 µg/mL, por lo que se utilizó esta concentración para seleccionar las transfectantes estables en un nuevo ensayo. En este segundo intento, solo se observó la resistencia a G418 en los parásitos transfectados con el vector que codifica para mCherry-profilina (pRiboTEX2-mCherry-profilina) (Figura 16B). Contrario a lo esperado, los controles de transfección (parásitos electroporados con pRiboTEX2) y de localización subcelular (parásitos electroporados con pRiboTEX2-mCherry) mostraron el mismo comportamiento de los parásitos electroporados sin DNA, es decir, fueron sensibles a G418.

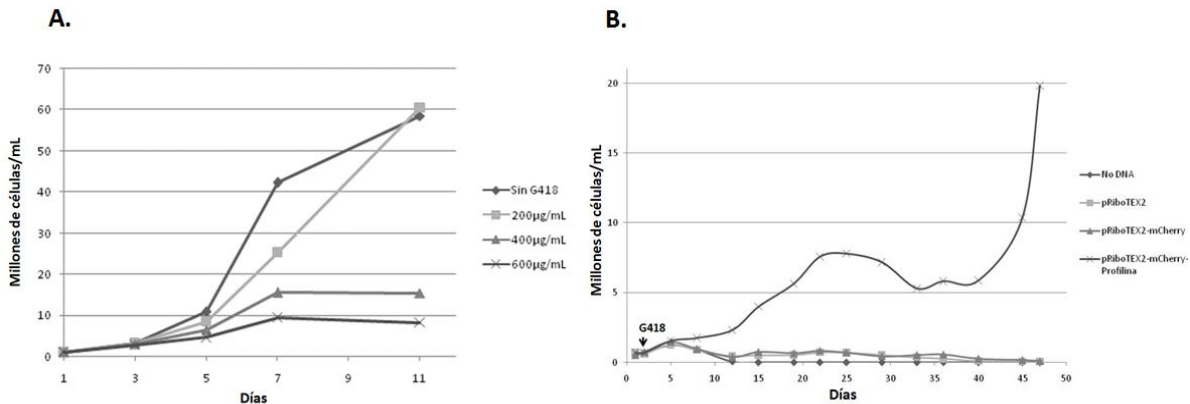


Figura 16. Curvas de crecimiento de epimastigotes en presencia de diferentes concentraciones de G418 (A.) y de los parásitos transfectados con los vectores de expresión para *T. cruzi* para estudiar la localización subcelular de profilina (B.). Se indica el momento en que se agregó G418 400 µg/mL para la selección de las transfectantes estables.

A pesar de que los controles de transfección y de localización subcelular no tuvieron el comportamiento esperado (resistencia a G418), se realizaron ensayos para determinar si la proteína de fusión mCherry-profilina se expresaba en los parásitos resistentes a G418 obtenidos en la transfección con pRiboTEX2-mCherry-profilina. En un ensayo de inmunoblot con un anticuerpo comercial anti-mCherry no se logró detectar ninguna señal que indicara la expresión de la proteína de fusión en extractos de proteína de los parásitos resistentes (Figura 17A). De igual manera, en observaciones por microscopía de fluorescencia de los parásitos resistentes tampoco se detectó fluorescencia que indicara la expresión de mCherry-profilina (Figura 17B).

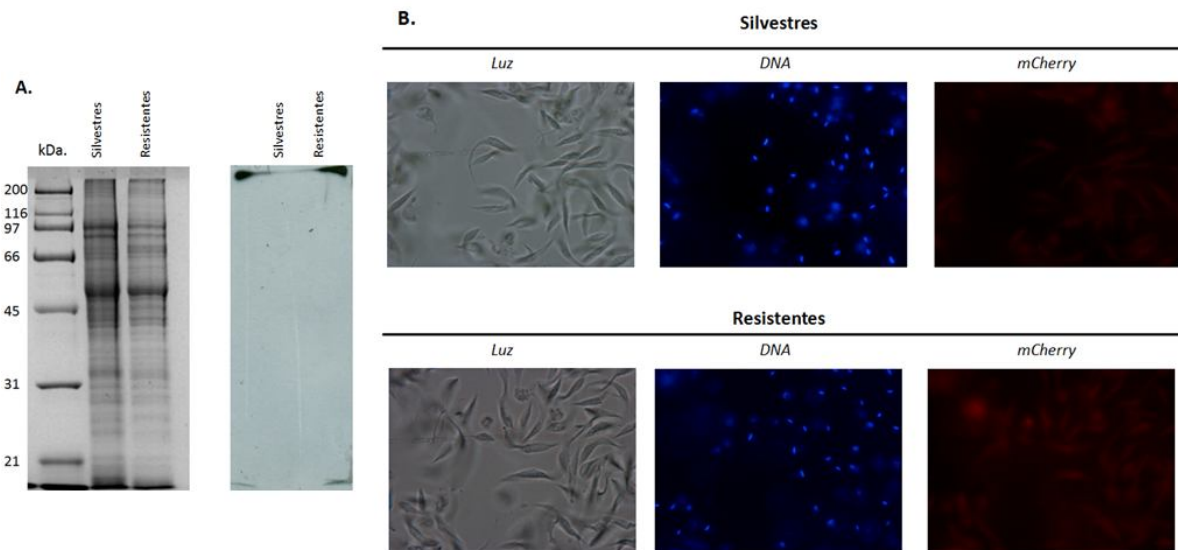


Figura 17. Caracterización de los parásitos transfectados con el vector pRiboTEX2-mCherry-profilina. (A.) SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie (Izquierda) de extractos de proteína de parásitos transfectados y no transfectados. Inmuno blot (Derecha) con anticuerpos anti-mCherry del material mostrado en el SDS-PAGE. (B.) Microscopia de fluorescencia (100X) de los parásitos. Se observa el DNA del núcleo y el cinetoplasto teñido con DAPI.

7.2. Obtención de profilina para la inmunización de ratones.

Los anticuerpos son herramientas de gran utilidad en biología celular y molecular. Uno de los objetivos de este trabajo es obtener anticuerpos policlonales que permitan la caracterización de profilina en *T. cruzi*. Para este fin, es necesario purificar el antígeno suficiente para inmunizar animales de laboratorio. Preparaciones enriquecidas con una proteína específica raramente pueden ser obtenidas de su fuente natural (Sorensen & Mortensen, 2005), razón por la cual el antígeno es comúnmente purificado como una versión recombinante de la proteína de interés expresada heterológamente en *E. coli* u otro organismo. Por esta razón, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio, se clonó la secuencia codificante de profilina en un vector diseñado para la expresión de proteínas fusionadas a una etiqueta de His(x6) en *E. coli* y se realizaron ensayos de expresión de esta proteína recombinante que no fueron exitosos (Herrera-López, 2008). Se decidió por lo tanto evaluar dos alternativas: 1. Purificar la profilina nativa de *T. cruzi* por cromatografía de afinidad por poli-prolinas; 2. Clonar a profilina en vectores de expresión para proteínas recombinantes fusionadas a etiquetas diferentes (en este caso GST y MBP) y realizar ensayos de expresión y purificación.

7.2.1. Purificación de profilina de *T. cruzi*.

La cromatografía de afinidad por poli-prolinas es una metodología que se basa en la alta afinidad de esta proteína por regiones ricas en este aminoácido y que ha sido usada de manera exitosa en el laboratorio del Dr. Federico Sánchez (con quien colaboramos para el uso de esta metodología) para purificar esta proteína de plantas (Vidali et al., 1995). Profilina puede encontrarse de manera soluble en el citoplasma o asociada a la membrana plasmática, por lo que para realizar este ensayo se prepararon dos extractos de proteínas: uno con las proteínas solubles en ausencia de detergente (extracto enriquecido en proteínas citosólicas) y uno con las proteínas insolubles del primer extracto solubilizadas en presencia de detergente (extracto enriquecido en proteínas de membrana). Estos extractos se pasaron por columnas que contenían una matriz en la cual se acoplaron poli-prolinas. Después de una serie de lavados, las proteínas unidas a la columna se liberaron con concentraciones altas de sales y el material eluido se precipitó y visualizó por SDS-PAGE. Aunque en todas las eluciones se detectaron proteínas, sólo se observó una banda en el rango de peso molecular esperado para profilina (~16 kDa) en la fracción eluida con la menor concentración de sales utilizada en el extracto enriquecido en proteínas de membrana (Figura 18). Esta proteína no fue utilizada para la producción de anticuerpos ya que, como se describirá a continuación, se logró expresar y purificar la cantidad suficiente de profilina recombinante en *E. coli* para realizar las inmunizaciones.

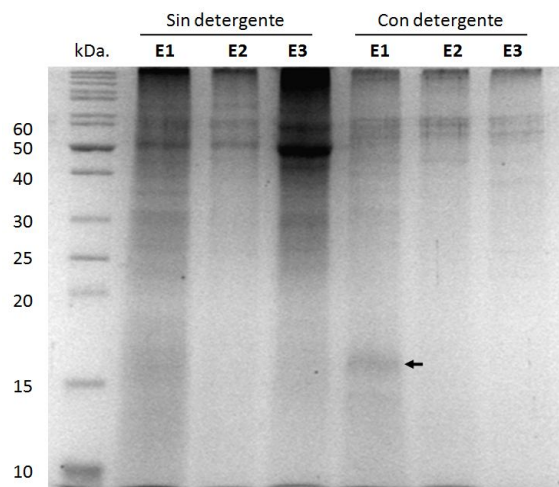


Figura 18. Purificación de profilina por cromatografía de afinidad por poli-prolinas. SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie de las proteínas unidas a las columnas de afinidad de los extractos de *T. cruzi* solubles en ausencia y presencia del detergente Tritón X-100 al 1%. La flecha indica la posición de la proteína con el peso molecular esperado de profilina (~16 kDa.). Carriles: Elución KCl 1 M (E1); Elución Urea 3 M (E2); Elución Urea 8 M (E3).

7.2.2. Expresión de profilina recombinante en *E. coli*.

Ya que en ensayos previos (Herrera-López, 2008) no se había logrado expresar a profilina recombinante, se clonó la secuencia de profilina en dos vectores diseñados para la expresión en *E. coli* de proteínas fusionadas a dos etiquetas diferentes: la glutatión S-transferasa (GST) y a la proteína de unión a maltosa (MBP) (Anexo 10.2). Con estos vectores recombinantes, se transformaron células de *E. coli* BL-21 y se indujeron con IPTG cultivos de clonas recombinantes. En estas bacterias, se observaron proteínas inducidas con respecto a bacterias crecidas en ausencia de IPTG en el rango de pesos moleculares esperado para ambas proteínas recombinantes (Figura 19). Para determinar la presencia de GST y MBP en las proteínas inducidas, se realizaron ensayos de inmuno blot con anticuerpos comerciales que reconocen las etiquetas correspondientes. Para ambos casos, los anticuerpos reconocieron las proteínas inducidas por el IPTG, lo que demostró la presencia de las etiquetas en las proteínas recombinantes. Aunque se logró expresar a profilina con las dos etiquetas, se decidió utilizar a la fusión con GST para purificar el antígeno necesario para la producción de los anticuerpos debido a que en nuestro laboratorio se han usado de manera exitosa fusiones con GST expresadas en *E. coli* para la producción de anticuerpos contra proteínas de *T. cruzi* (Cevallos et al., 2011).

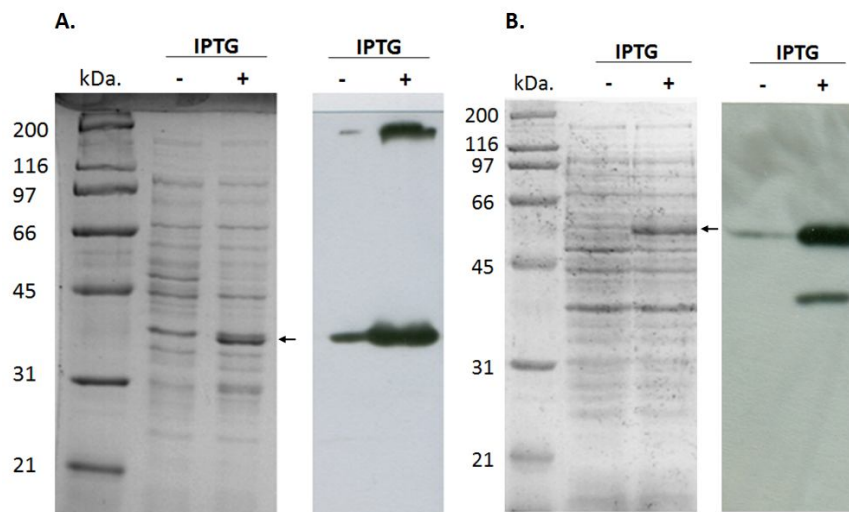


Figura 19. Expresión de GST-profilina (A) y MBP-profilina (B). SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie (Izquierda) de lisados de *E. coli* no inducidos (-) e inducidos (+) con IPTG. Inmuno blot (Derecha) con anticuerpos anti-GST y anti-MBP del material mostrado en el SDS-PAGE. Las proteínas inducidas poseen el peso molecular esperado para ambas fusiones (~42 kDa. para GST-profilina y ~59.2 kDa. para MBP-profilina) y son reconocidas por los anticuerpos correspondientes para cada etiqueta.

7.2.3. Purificación de GST-profilina.

El primer paso para purificar a GST-profilina fue determinar si la proteína recombinante se encontraba en la fracción soluble de los extractos de proteína o en cuerpos de inclusión. Para este fin, se lisaron bacterias inducidas y se incubaron en presencia del Tritón X-100 para solubilizar las proteínas. Después de separar las fracciones soluble e insoluble por centrifugación (sobrenadante y *pellet*, respectivamente) y visualizarlas en geles de SDS-PAGE, la proteína recombinante se detectó principalmente en la fracción soluble (Figura 20A). A partir de fracciones solubles de cultivos inducidos, se purificó la proteína recombinante por cromatografía de afinidad por glutatión inmovilizado en sefarosa. En SDS-PAGE del material obtenido usando esta metodología, sólo fue evidente una proteína que corresponde a GST-profilina en las eluciones de la matriz de afinidad (Figura 20B). Se realizaron varias rondas de purificación hasta obtener la cantidad suficiente de proteína para inmunizar 10 ratones (~300 µg). Las eluciones obtenidas de todas las purificaciones se unieron, se concentró la proteína recombinante por ultrafiltración (Figura 20C), se cuantificó y se ajustó a la concentración deseada para las dosis de antígeno que se suministraron en cada inmunización (10 µg de proteína en 100 µL de volumen).

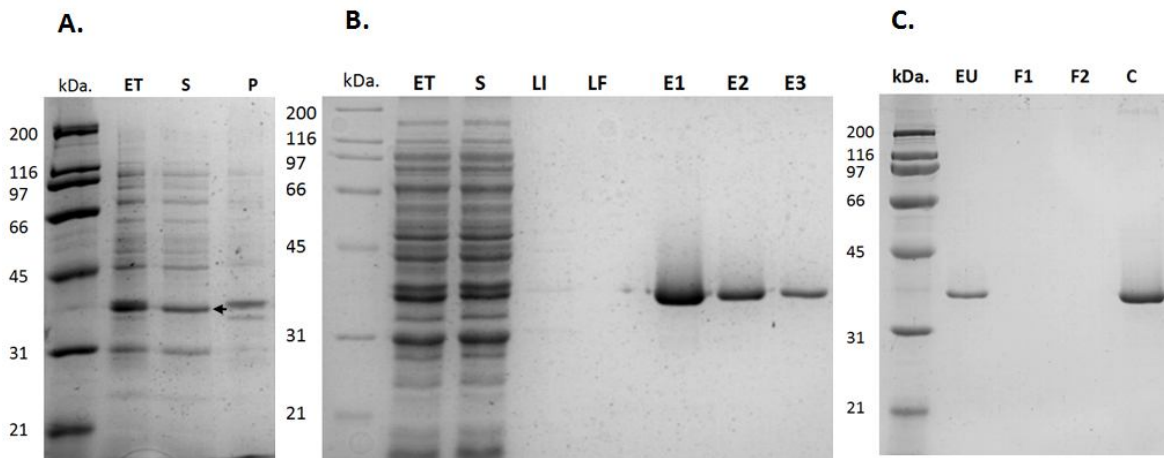


Figura 20. Purificación de profilina recombinante fusionada a GST. **(A)** Prueba de solubilidad de la proteína recombinante en PBS 1X- Tritón X-100 al 1%: Extracto total de bacterias inducidas (ET), fracción soluble (S) y no soluble (P). La banda correspondiente a la proteína recombinante se indica con una flecha. **(B)** Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad: Extracto total de bacterias inducidas (ET), fracción soluble (S), lavados inicial (LI) y final (LF) de la matriz de afinidad y eluciones (E1-E3). **(C)** Concentrado de la proteína recombinante por ultrafiltración: Eluciones unidas (EU), filtrados (F1 y F2) y proteína concentrada (C).

7.3. Caracterización de sueros policlonales anti-profilina.

Se analizaron por ensayos de inmuno blot sueros obtenidos de ocho ratones inmunizados con la proteína recombinante GST-profilina (inicialmente se inmunizaron 10 ratones, pero murieron 2 durante el periodo de inmunización). Todos los sueros reconocen una proteína en el rango de pesos moleculares teórico de profilina (~16kDa) que no es reconocida por los sueros pre-inmunes en extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi* (Figura 21). La intensidad y especificidad de reconocimiento de la proteína de 16 kDa por parte de los sueros es diferente. En cinco de los sueros (1, 2, 3, 5 y 6) se observó una intensidad similar en el reconocimiento de la proteína mencionada. En los tres sueros restantes (4, 8 y 10) la intensidad de reconocimiento fue menor. Sin embargo, cabe mencionar que para dos de los sueros (1 y 2) el factor de dilución utilizado para realizar el ensayo fue menor al de los otros seis (1:1000 vs. 1:2000). En cuanto a la especificidad, en tres de los sueros (1, 3 y 8) es evidente el reconocimiento de al menos una proteína de mayor peso molecular a 16 kDa. El reconocimiento de otras proteínas fue observada en los sueros restantes. Sin embargo, la intensidad de las bandas observadas es muy débil y no es producto del proceso de inmunización, ya que son también detectadas por los sueros pre-inmunes. Para completar la caracterización de los sueros, se eligieron dos sueros que reconocieran específicamente y con mayor intensidad la proteína de 16 kDa (sueros 5 y 6) para determinar si reconocían a profilina recombinante. Para este fin, se realizaron ensayos de inmuno blot con extractos proteína de *E. coli* expresando las dos fusiones de profilina (GST-profilina y MBP-profilina) obtenidas como se describió previamente. Como controles, se utilizaron extractos de proteína de *E. coli* expresando las etiquetas (GST y MBP) (Figura 22A). Como se esperaba, se observó reconocimiento de las dos versiones recombinantes de profilina por parte de los dos sueros (Figura 22B y C). Solo se observó reconocimiento de la etiqueta GST pero no de MBP, lo cual se esperaba porque los animales fueron inmunizados con GST-profilina. Esto demuestra que los sueros poseen anticuerpos que reconocen a la profilina de *T. cruzi* y demuestran la expresión de esta proteína en los epimastigotes.

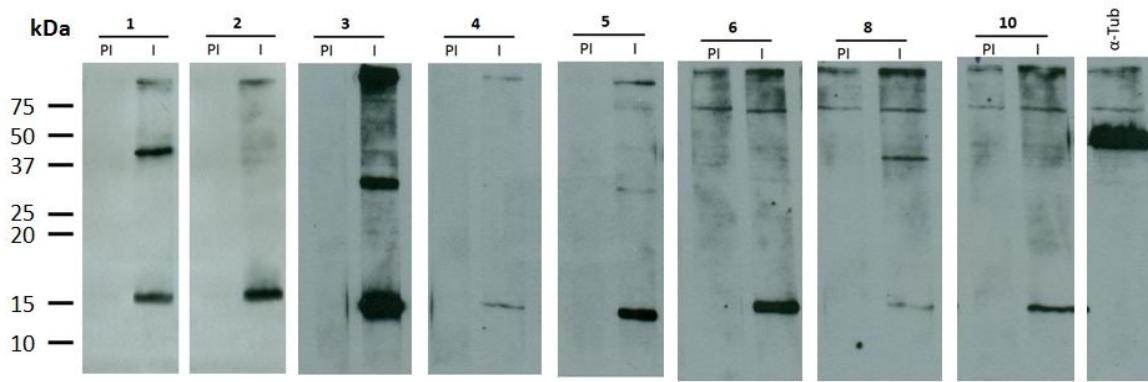


Figura 21. Reconocimiento de proteínas de epimastigotes de *T. cruzi* por parte de los sueros pre-inmunes (PI) e inmunes (I) de los ocho ratones inmunizados con la proteína recombinante GST-profilina. Como control positivo de los ensayos se utilizó un anticuerpo comercial que reconoce la α -tubulina de *T. cruzi*. Se cargaron $\sim 5 \times 10^6$ epimastigotes por carril.

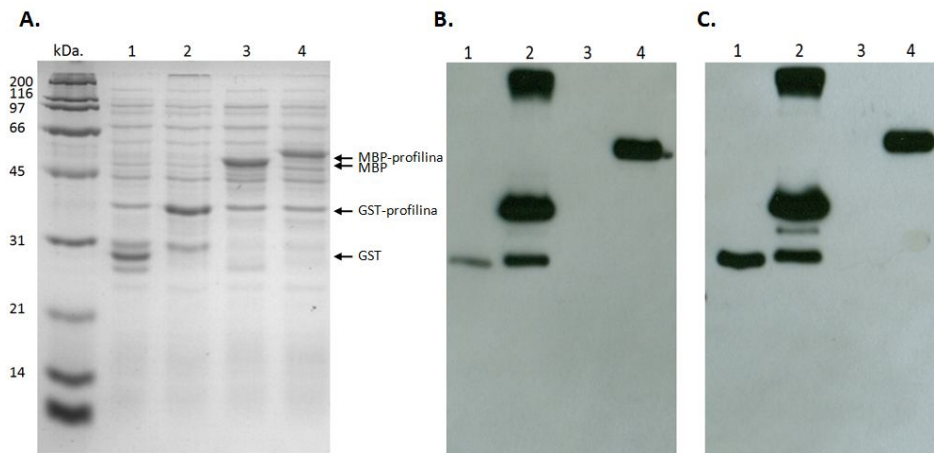


Figura 22. Reconocimiento de profilinas recombinantes expresadas en *E. coli* por parte de los sueros inmunes 5 y 6. Se muestran extractos totales de *E. coli* BL-21 inducidos con IPTG 1mM expresando las siguientes proteínas recombinantes: GST (Carril 1), GST-profilina (Carril 2), MBP (Carril 3) y MBP-profilina (Carril 4). (A.) SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. En los ensayos de inmuno blot con los sueros 5 (B.) y 6 (C.) se observa reconocimiento de las profilinas fusionadas a ambas etiquetas (Carriles 2 y 4) y de la etiqueta GST (Carril 1), pero no de la etiqueta MBP (Carril 3).

7.4. Expresión de profilina en *T. brucei* y *Leishmania major*.

Los datos anteriores demuestran la expresión de profilina en *T. cruzi*. Búsquedas bioinformáticas en las secuencias liberadas de genomas de tripanosomátidos, revelaron la presencia de al menos un gen ortólogo a profilina en todas las especies (Tabla 4). Cuando se compararon las secuencias de aminoácidos codificadas por estos genes, los porcentajes de identidad y similitud observados fueron mayores al 74% y 86%, respectivamente. Dada esta alta similitud, es muy probable que los anticuerpos anti-profilina obtenidos también

reconozcan profilinas de otros tripanosomátidos. Para evaluar esta posibilidad, se realizaron ensayos de inmuno blot con extractos de proteína de promastigotes procíclicos de *T. brucei* y *L. major* (Figura 23A) con uno de los sueros caracterizados como se describió en la sección anterior (suero 5). Se observó reconocimiento de una proteína en el rango de peso molecular teórico para profilina en *L. major* y dos señales menos intensas en *T. brucei* (Figura 23B). Aunque bajo las condiciones experimentales el suero usado reconoció proteínas adicionales, estos resultados sugieren que profilina se expresa en otras especies de tripanosomátidos.

#	Especie	Numero de acceso	Anotación	Longitud	PM	Identidad	Similitud
1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tc00.1047053458759.10	Profilina, putativo	150	16.1	-	-
2	<i>T. congolense</i>	TcIL3000.11.14170	Hipotético	150	16.1	84	93
3	<i>T. brucei</i>	Tb11.01.5350	Profilina	150	16.1	84	92
4	<i>T. vivax</i> 1	TvY486_1114590	Profilina, putativo	150	16.1	81	91
5	<i>T. vivax</i> 2	TvY486_1114610	Profilina, putativo	150	16.1	80	90
6	<i>Leishmania infantum</i>	LinJ32_V3.0550	Profilina, putativo	150	16.1	76	86
7	<i>L. major</i>	LmjF32.0520	Profilina, putativo	150	16.1	75	86
8	<i>L. mexicana</i>	LmxM.31.0520	Profilina, putativo	150	16.2	75	86
9	<i>L. tarentolae</i>	LtaP32.0570	Profilina, putativo	150	16.1	75	88
10	<i>L. braziliensis</i>	LbrM32_V2.0570	Profilina, putativo	150	15.8	74	86

Tabla 4. Genes de profilina en tripanosomátidos. Se realizó una búsqueda usando Blastp en la base de datos TriTrypDB v 4.1 (Aslett et al., 2010) usando como problema la secuencia de aminoácidos de profilina de *T. cruzi*. Se muestran los números de acceso y la anotación de las secuencias en TriTrypDB, la longitud en número de aminoácidos, el peso molecular teórico (PM) en kDa. y la identidad y similitud en porcentajes con respecto a la profilina de *T. cruzi*.

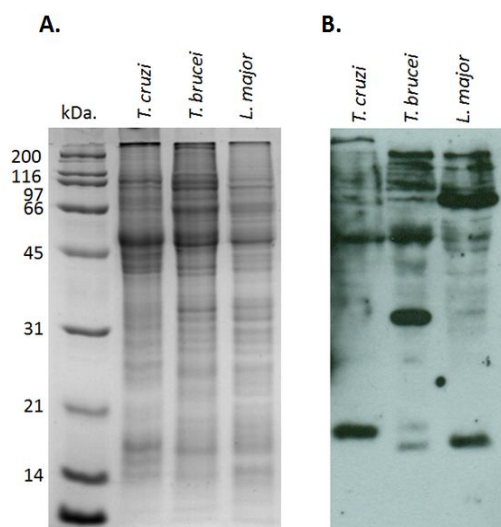


Figura 23. Detección de profilina en *T. brucei* y *L. major*. **(A)** SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de extractos totales de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*. **(B)** Inmuno blot con el suero 5 del material mostrado en el SDS-PAGE. En cada carril se cargaron $\sim 5 \times 10^6$ parásitos.

8. DISCUSIÓN

A pesar de la ausencia en los tripanosomátidos de microfilamentos de actina que puedan ser observados por microscopía electrónica (Gull, 1999) o por tinción con faloidina (Sahasrabudde et al., 2004), estudios por microscopía de fluorescencia con anticuerpos homólogos anti-actina (Sahasrabudde et al., 2004; Nayak et al., 2005) y ensayos de polimerización con actina recombinante (Kapoor et al., 2008), sugieren fuertemente que la actina expresada por estos organismos puede formar polímeros. Análisis de fraccionamiento celular con detergentes en *L. donovani* (Sahasrabudde et al., 2004) y en *T. cruzi* (DeMelo et al., 2008; Cevallos et al., 2011) indican que la mayoría de la actina celular se encuentra en forma de monómeros o de filamentos cortos no asociados con el citoesqueleto de microtúbulos. Dado que en los eucariotas la dinámica de polimerización de la actina es regulada por la interacción con proteínas de unión a actina, lo anterior sugiere que en los tripanosomátidos la polimerización de la actina debe ser regulada por la interacción con estas proteínas. El análisis de las secuencias genómicas de estos parásitos identificó genes codificadores para un repertorio de proteínas reguladoras (Berriman et al., 2005; DeMelo et al. 2008). A la fecha sólo se demostró la expresión de una de estas proteínas (ADF/cofilina) (Tammana et al., 2008). En el presente trabajo se demuestra la expresión a nivel de proteína de un regulador central de la dinámica de polimerización de actina en las células eucariotas, la profilina en *T. cruzi*.

Búsquedas en el banco de datos de las secuencias genómicas muestran que *T. cruzi* posee un gran número de genes codificadores para actinas y para proteínas reguladoras de su polimerización en comparación a otras especies de tripanosomátidos. Análisis filogenéticos muestran que *T. cruzi* posee 12 genes codificantes para proteínas de la familia de las actinas (Cevallos et al., 2011). Dos de estos genes no poseen contrapartes en ningún otro tripanosomátido y uno de ellos está presente sólo en *T. cruzi* y *Leishmania*. En las proteínas reguladoras de la dinámica de actina se observa una situación similar (Berriman et al., 2005; DeMelo et al., 2008). En adición a dos genes codificadores para forminas conservados en los tripanosomátidos, en *T. cruzi* se ha identificado un gen parálogo exclusivo de esta especie. Las subunidades α y β que forman a CapZ también están presentes de manera exclusiva en *T. cruzi*. Además, a diferencia de *Leishmania*, en *Trypanosoma* están presentes todas las subunidades canónicas de Arp2/3, lo que sugiere la

presencia de un complejo nucleador funcional de este tipo (DeMelo et al., 2008). La familia de las miosinas, proteínas motoras que se mueven sobre los microfilamentos y están involucradas en procesos como el tráfico intracelular de vesículas, la mitosis y la locomoción celular, también se encuentra expandida en *T. cruzi*. Además de los dos genes de miosinas conservados en los tripanosomátidos, en esta especie se han identificado seis genes codificadores para miosinas adicionales, uno de los cuales no puede ser clasificado en ninguno de los tipos de miosinas actualmente reconocidos (Foth et al., 2006). La importancia funcional de las diferencias mencionadas debe ser evaluada experimentalmente.

Una herramienta que ha mostrado ser de gran utilidad para caracterizar genes en *T. cruzi* son los vectores de expresión. En el presente trabajo se clonó la secuencia codificante para profilina fusionada a la proteína roja fluorescente mCherry en una versión modificada de un vector de expresión para *T. cruzi* construido en nuestro laboratorio (Martínez-Calvillo et al., 1997): pRiboTEX2. Con este vector recombinante se realizaron intentos para generar transfectantes estables. En sólo uno de los ensayos se obtuvo el fenotipo de resistencia a G418 esperado y se evidenció la presencia de DNA del vector, pero no se logró detectar la expresión de la proteína de fusión. Se pueden plantear tres explicaciones de lo anterior: 1. La proteína se expresó pero no se logró detectar; 2. El gen se expresó pero el RNA mensajero o la proteína se degradaron; 3. El gen no se transcribió. Ninguna estas posibilidades fue evaluada, ya que los controles de transfección y localización subcelular no dieron los resultados esperados. Sin embargo, las construcciones realizadas podrían ser usadas en nuevas transfecciones para estudiar la localización subcelular de profilina y su co-localización con las diferentes formas de actina presentes en *T. cruzi*, así como con otras proteínas reguladoras de la dinámica de polimerización de la actina. Además, ya que el vector de expresión posee una secuencia promotora del DNA ribosomal (un promotor transcripcional fuerte), también podría ser útil para analizar posibles efectos fenotípicos asociados con la sobre-expresión de profilina.

Profilina es una proteína conservada en estructura terciaria, pero diversa en patrón de expresión y función. Puede ser codificada por varios genes o por genes de copia única. Se ha identificado en diversas concentraciones y regiones de la célula, incluyendo sitios de dinámica de polimerización activa de actina y el núcleo celular. En cuanto a su función,

típicamente profilina se ha descrito como una proteína reguladora de la dinámica de polimerización de la actina. Sin embargo, existen en la literatura trabajos que demuestran que posee actividades adicionales como: ser co-factor para el transporte de la actina desde el núcleo celular hacia el citoplasma (Stuven et al., 2003), regular la actividad de un factor de transcripción (Lederer et al., 2005), intervenir en vías de señalización celular a través de la regulación del metabolismo de PIPs (Goldschmidt-Clermont et al., 1991), y participar en el *splicing* de RNA (Skare et al., 2003) y en la transcripción (Soderberg et al., 2012). En el presente trabajo se desarrollaron anticuerpos policlonales anti-profilina y profilinas recombinantes fusionadas a dos etiquetas diferentes (GST y MBP). Estas herramientas ayudarán a dilucidar el papel de profilina en la dinámica de polimerización de la actina y en otros procesos celulares en *T. cruzi*. Entre los estudios que se piensan realizar se encuentran: demostrar la expresión de profilina en otros estadios del ciclo de vida; experimentos de fraccionamiento celular para estimar la proporción de profilina presente en el núcleo, el citoplasma, asociada a la membrana plasmática y en otros compartimentos celulares; co-localizaciones de actina y profilina que puedan indicar sitios de polimerización activa; y ensayos de inmunoprecipitación para identificar ligandos de profilina.

Aunque en la estructura de todas las profilinas se pueden identificar regiones para la interacción con tres tipos de ligandos (actina G, proteínas con regiones ricas en prolina y PIP), estas interacciones pueden presentarse con diferentes proteínas y afinidades. Esto es especialmente cierto para los ligandos que interactúan a través de regiones ricas en prolina. A pesar del alto grado de conservación que se presenta a nivel de secuencia y estructura en el sitio de unión a poli-prolinas, profilina interactúa con la mayoría de sus ligandos a través de esta región. Los ligandos incluyen proteínas que participan en la organización del citoesqueleto, la motilidad celular, la maduración de ribonucleoproteínas, el transporte intracelular y la transcripción (Jockusch et al., 2007). La afinidad de las interacciones de profilina con estas proteínas varía dependiendo de la isoforma de profilina, del ligando, y del estado de fosforilación de profilina (Shao et al., 2008; Shao & Diamond, 2012; Aparicio-Fabre et al., 2006). En el presente trabajo se purificó una proteína en el rango del peso molecular de la profilina de extractos de *T. cruzi* mediante cromatografía de afinidad por poli-prolinas. Esta proteína se liberó a una concentración baja de sales en comparación a la usada con profilinas de plantas (KCl 1M vs. Urea 8M) (Vidali et al., 1995), lo que

sugiere una menor afinidad por regiones ricas en prolina. Aunque no se confirmó la identidad de la proteína como profilina, estos resultados sugieren la presencia de una proteína con características de profilina (se une con poliprolinas y tiene el peso molecular esperado de la profilina) en *T. cruzi*.

Las actinas con todos sus componentes reguladores y proteínas motoras asociadas fueron una adquisición temprana en la evolución de los eucariotas, posiblemente estando presentes en el último ancestro común eucariota (LECA) (Wickstead & Gull, 2012). Sin embargo, desde LECA algunas de estas proteínas se han diversificado y adquirido nuevas funciones, mientras que otras se han perdido. También se han incorporado componentes novedosos en ciertos linajes. Reflejo de estos procesos evolutivos son las diferencias que se observan en la regulación de la dinámica de polimerización de la actina en los eucariotas actuales. En las células mamíferas, por ejemplo, la dinámica de actina se explica por el modelo de *treadmilling*. En este modelo se presenta un flujo unidireccional y continuo de monómeros de actina desde el extremo (-) hacia el extremo (+), generando filamentos dinámicos con una longitud más o menos constante (Dos Remedios et al., 2003). En plantas se ha propuesto un modelo diferente al *treadmilling* llamado dinámica estocástica (Blanchoin et al., 2010), en el cual los filamentos de actina crecen rápidamente y, casi de inmediato, son desensamblados por la acción de proteínas que los cortan en fragmentos pequeños. Un tercer modelo de la dinámica de polimerización de actina ha sido propuesto para explicar la motilidad basada en actina-miosina en los parásitos apicomplexos (Schuler & Matuschewski, 2006). En este modelo se generan filamentos de actina cortos que son estabilizados en el extremo (+) por la unión de proteínas de capeo. Posteriormente, interactúan con un sistema de proteínas motoras y de proteínas de adhesión transmembranal, generando la fuerza necesaria para mover la célula. Por último, se despolimerizan los filamentos por el extremo (-) y se reciclan los monómeros. Las características moleculares inusuales de las actinas codificadas por los tripanosomátidos y las diferencias en el repertorio de sus posibles componentes reguladores con respecto a otros organismos, sugiere la existencia de un sistema novedoso regulador de la dinámica de polimerización de la actina que merece ser estudiado desde el punto de vista biológico.

9. CONCLUSIÓN

Se expresó y purificó en *E. coli* una versión de la profilina de *T. cruzi* fusionada a GST con la cual se inmunizaron ratones para la producción de sueros policlonales. Los sueros reconocen una proteína del peso molecular teórico de profilina (~16 kDa.) en extractos de proteína de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, lo que demuestra la expresión de esta proteína en los tripanosomátidos. Además, se generaron además herramientas moleculares (vectores de expresión, proteínas recombinantes y anticuerpos) que permitirán la caracterización de esta proteína en proyectos futuros.

10. REFERENCIAS.

- Aparicio-Fabre R, Guillen G, Estrada G, Olivares-Grajales J, Gurrola G, Sánchez F. 2006. Profilin tyrosine phosphorylation in poly-L-proline-binding regions inhibits binding to phosphoinositide 3-kinase in *Phaseolus vulgaris*. *Plant J.* 47: 491-500.
- Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, et al. 2010. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* 38: D457-462.
- Bern C, Martin DL, Gilman RH. 2011. Acute and congenital Chagas disease. En: Weiss LM, Tanowitz HB, Kirchhoff LV (Eds.). *Advances in parasitology. Chagas Disease, Part A.* Elsevier. pp 19-47.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et al. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science.* 309: 416-422.
- Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Henty JL, Khurana P, Staiger CJ. 2010. Actin dynamics in plant cells: a team effort from multiple proteins orchestrates this very fast-paced game. *Curr Opin Plant Biol.* 13: 714-723.
- Camargo EP. 1964. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*, origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 12: 98-100.
- Carlsson L, Nystrom LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U. 1977. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol.* 115: 465-483.
- Cevallos AM, Segura-Kato YX, Merchant-Larios H, Manning-Cela R, Hernández-Osorio LA, Márquez-Dueñas C, et al. 2011. *Trypanosoma cruzi*: Multiple actin isoforms are observed along different developmental stages. *Exp Parasitol.* 127: 249-259.
- Chang F, Drubin D, Nurse P. 1997. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol.* 137: 169-82.
- Crivat G, Taraska JW. 2012. Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. *Trends Biotechnol.* 30: 8-16.
- Cooper HM, Paterson Y. 2009. Production of polyclonal antisera. En: *Current Protocols in Neuroscience* 5.5.1-5.5.10. John Wiley & Sons, Inc. DOI: 10.1002/0471142301.
- DeMelo LDB, Sant'anna C, Reis SA, Lourenco D, De Souza W, Lopes UG, et al. 2008. Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. *Parasitology.* 135: 955-965.
- Dominguez R. 2004. Actin-binding proteins – a unifying hypothesis. *Trends Biochem Sci.* 29: 572-578.
- Dominguez R. 2009. Actin filament nucleation and elongation factors – structure – function relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 44: 351-366.
- Dominguez R, Holmes KC. 2011. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys.* 40: 169-186.

- Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, et al. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83: 433-473.
- Fletcher DA, Mullins RD. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 463: 485-491.
- Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. 2006. New insights into myosin evolution and classification. *PNAS.* 103: 3681-3686.
- García-Salcedo JA, Pérez-Morga D, Gijón P, Dilbeck V, Pays E, Nolan DP. 2004. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 23: 780-789.
- Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, et al. 1999. A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with SMN in nuclear gems. *J Biol Chem.* 274: 37908-37914.
- Giesemann T, Schwarz G, Nawrotzki R, Berhörster K, Rothkegel M, Schluter K, et al. 2003. Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci.* 23: 8330–8339.
- Goldschmidt-Clermont PJ, Kim JW, Machesky LM. 1991. Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science.* 251: 1231-1233.
- Goode BL, Eck MJ. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem.* 76: 593-627.
- Gull K. 1999. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol.* 53: 629-655.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor analysis program for Windows 95/97/NT. *Nucle Acids Symp Ser.* 41: 95-98.
- Haugwitz M, Noegel AA, Rieger D, Lottspeich F, Schleicher M. 1991. *Dictyostelium discoideum* contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci.* 100: 481-489.
- Herrera-López J. 2008. Biología de profilina en *Trypanosoma cruzi*. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hild G, Bugyi B, Nyitrai M. 2010. Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function. *Cytoskeleton.* 67: 609-629.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347: 44-49
- Jockusch BM, Murk K, Rothkegel M. 2007. The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 159: 131-149.
- Kaiser DA, Sato M, Ebert RF, Pollard TD. 1986. Purification and characterization of two isoforms of *Acanthamoeba* profilin. *J Cell Biol.* 102: 221-226.
- Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB. 2002. Plant profilin isovariants are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motil Cytoskeleton.* 52: 22-32.

Kang F, Laine RO, Bubb MR, Southwick FS, Purich DL. 1997. Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP): implications for actin-based *Listeria* motility. *Biochemistry*. 36: 8384-8392.

Karlsson R, Lindberg U. 2007. Profilin, an essential control element for actin polymerization. En: Lappalainen P (Ed.). *Actin-monomer-binding proteins*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. pp 29-44.

Kapoor P, Sahasrabudhe AA, Kumar A, Mitra K, Siddiqi MI, Gupta CM. 2008. An Unconventional Form of Actin in Protozoan Hemoflagellate, *Leishmania*. *J Biol Chem*. 283: 22760-22773.

Kapoor P, Kumar A, Naik R, Ganguli M, Siddiqi MI, Sahasrabudhe AA, Gupta CM. 2010. *Leishmania* actin binds and nicks kDNA as well as inhibits decatenation activity of type II topoisomerase. *Nucleic Acids Res*. 38: 3308-3317.

Karakesisoglou I, Schleicher M, Gibbon BC, Staiger CJ. 1996. Plant profilins rescue the aberrant phenotype of profilin-deficient *Dictyostelium* cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 34: 36-47.

Kirchhoff LV. 2011. Epidemiology of American Trypanosomiasis. En: Weiss LM, Tanowitz HB, Kirchhoff LV (Eds.). *Advances in parasitology*. Chagas Disease, Part A. Elsevier. pp 1-18.

Krishnan K, Moens PDJ. 2009. Structure and functions of profilins. *Biophys Rev*. 1:71-81.

Kumar G, Srivastava R, Mitra K, Sahasrabudhe AA, Gupta CM. 2012. Overexpression of S4D mutant of *Leishmania* ADF/cofilin impairs flagellum assembly by affecting actin dynamics. *Eukaryot Cell*. 11: 752-760.

Kursula I, Kursula P, Ganter M, Panjekar S, Matuschewski K, Schuler H. 2008. Structural basis for parasite-specific functions of the divergent profilin of *Plasmodium falciparum*. *Structure*. 16: 1638-1648.

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

Lederer M, Jockusch BM, Rothkegel M. 2005. Profilin regulates the activity of p42^{POP}, a novel Myb-related transcription factor. *J Cell Sci*. 118: 331-341.

Lee SH, Dominguez R. 2010. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells*. 29: 311-325.

Lu H, Buck GA. 1991. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 44: 109-114.

Lu J, Pollard TD. 2001. Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol Biol Cell*. 12: 1161-1175.

Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*. 127: 107-115.

- Mahoney NM, Janmey PA, Almo SC. 1997. Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nat Struct Biol.* 4: 953-960.
- Makioka A, Kumagai M, Hiranuka K, Kobayashi S, Takeuchi T. 2012. Expression analysis of *Entamoeba invadens* profilins in encystation and excystation. *Parasitol Res.* 110: 2095-2104.
- Mayboroda O, Schluter K, Jockusch BM. 1997. Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 37: 166-177.
- Martínez-Calvillo S, López I, Hernández R. 1997. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene.* 199: 71-76.
- Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martinez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. 2010. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 525241.
- McCollum D, Feoktistova A, Morphew M, Balasubramanian M, Gould KL. 1996. The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. *EMBO J* 15:6438-6446.
- Mortara RA. 1989. Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. *J Protozool.* 36: 8-13.
- Muller J, Oma Y, Vallar L, Friederich E, Poch O, Winson B. 2005. Sequence and comparative genomic analysis of actin-related proteins. *Mol Biol Cell.* 16: 5736-5748.
- Nayak RC, Sahasrabudhe AA, Bajpai VK, Gupta CM. 2005. A novel homologue of coronin colocalizes with actin in filament-like structures in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 143: 152-164.
- Paredes AR, Assaf ZJ, Sept D, Timofejeva L, Dawson SC, Wanga CJR, et al. 2011. An actin cytoskeleton with evolutionarily conserved functions in the absence of canonical actin-binding proteins. *PNAS.* 108: 6151-6156.
- Perelroizen I, Marchand J-B, Blanchoin L, Didry D, Carlier M-F. 1994. Interaction of profilin with G-actin and poly(L-proline). *Biochemistry.* 33: 8472-8478.
- Pollard TD, Cooper JA. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* 326:1208-1212.
- Porta JC, Borgstahl GEO. 2012. Structural basis for profilin-mediated actin nucleotide exchange. *J Mol Biol.* 418: 103-116.
- Portman N, Gull K. 2012. Proteomics and the *Trypanosoma brucei* cytoskeleton: advances and opportunities. *Parasitology.* 139: 1168-1177.
- Qualmann B, Kessels MM. 2009. New players in actin polymerization - WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol.* 19: 276-285.
- Radauer C, Breiteneder H. 2007. Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 120: 518-525.

- Reinhard M, Giehl K, Abel K, Haffner C, Jarchau T, Jockusch BM, et al. 1995. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* 14: 1583-1589.
- Sahasrabudde AA, Bajpai VK, Gupta CM. 2004. A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterization, subcellular localization and association with subpellicular microtubules. *Mol Biochem Parasitol.* 134: 105-114.
- Schoenenberger C-A, Mannherz HG, Jockusch BM. 2011. Actin: from structural plasticity to functional diversity. *Eur J Cell Biol.* 90: 797-804.
- Schuler H, Matuschewski K. 2006. Regulation of Apicomplexan microfilament dynamics by a minimal set of actin-binding proteins. *Traffic.* 7: 1433-1439.
- Schlüter K, Schleicher M, Jockusch BM. 1998. Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I. *J Cell Sci.* 111: 3261-3273.
- Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NC, Lindberg U. 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature.* 28: 810-816.
- Shao J, Welch WJ, Diprospero NA, Diamond MI. 2008. Phosphorylation of profilin by ROCK1 regulates polyglutamine aggregation. *Mol Cell Biol.* 28: 5196-5208.
- Shao J, Diamond MI. 2012. Protein phosphatase 1 dephosphorylates profilin-1 at Ser-137. *PLoS ONE.* 7: e32802.
- Skare P, Kreivi JP, Bergstrom A, Karlsson R. 2003. Profilin I colocalizes with speckles and Cajal bodies: a possible role in pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res.* 286: 12-21.
- Soderberg E, Hessle V, von Euler A, Visa N. 2012. Profilin is associated with transcriptionally active genes. *Nucleus.* 3: 1-10.
- Sohn RH, Chen J, Koblan KS, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ. 1995. Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin. *J Biol Chem.* 270: 21114-21120.
- Sorensen HP, Mortensen KK. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 115: 113-128.
- Stuken T, Hartmann E, Gorlich D. 2003. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes. *EMBO J.* 22: 5928-5940.
- Tammana TVS, Sahasrabudde AA, Mitra K, Bajpai VK, Gupta CM. 2008. Actin-depolymerizing factor, ADF/cofilin, is essentially required in assembly of *Leishmania* flagellum. *Mol Microbiol.* 70: 837-852.
- Tammana TVS, Sahasrabudde AA, Bajpai VK, Gupta CM. 2010. ADF/cofilin-driven actin dynamics in early events of *Leishmania* cell division. *J Cell Sci.* 123: 1894-1901.
- Tyler KM, Engman DM. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 31: 472-481.
- Vidali L, Pérez HE, Valdés López V, Noguez R, Zamudio F, Sánchez F. 1995. Purification, characterization, and cDNA cloning from *Phaseolus vulgaris*. *Plan Physiol.* 108: 115-123.

Wang F, Jing Y, Wang Z, Mao T, Samaj J, Yuan M, et al. 2009. *Arabidopsis* profilin isoforms, PRF1 and PRF2, show distinctive binding activities and subcellular distributions. *J Integr Plant Biol.* 51: 113-121.

WHO. 2010. Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet. *Wkly Epidemiol Rec.* 85: 334-336.

Wickstead B, Gull K. 2012. The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 194: 513-525.

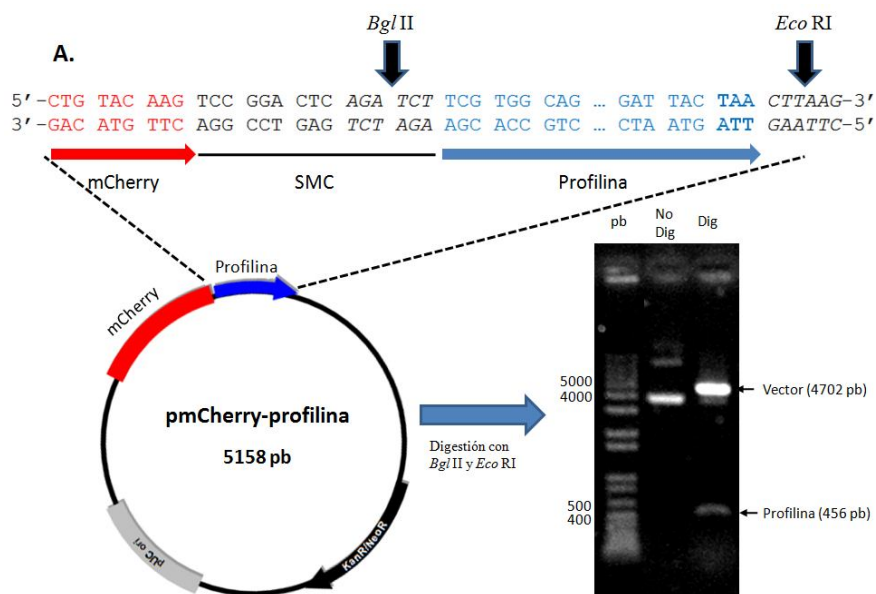
Wilson W, Seebeck T. 1997. Identification of a profilin homologue in *Trypanosoma brucei* by complementation screening. *Gene.* 187: 201-209.

Witke W. 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* 14: 461-469.

11. ANEXOS.

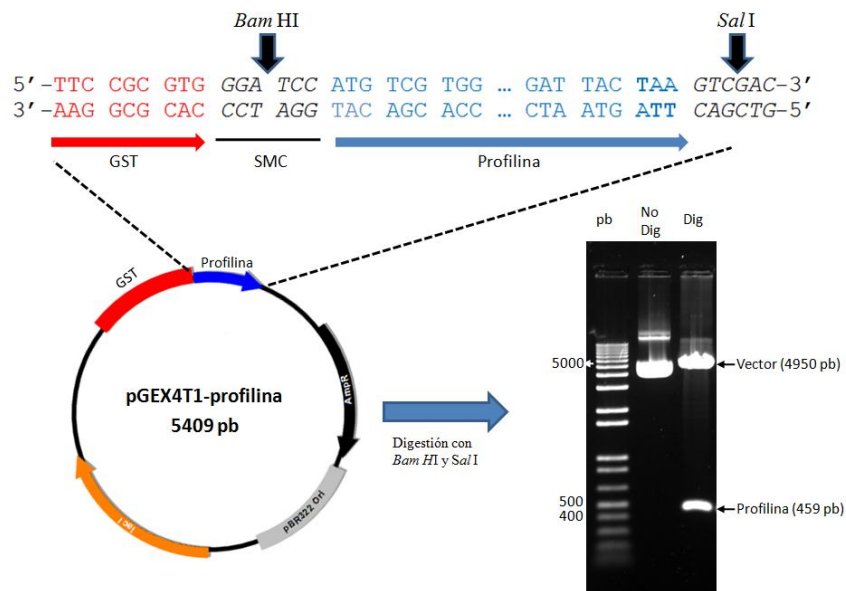
11.1. Construcción de vectores de expresión para *T. cruzi*.

Se clonó la secuencia codificante de profilina fusionada a la proteína roja fluorescente mCherry en una versión de un vector diseñado en nuestro laboratorio para la expresión de proteínas en *T. cruzi* (Martínez-Calvillo et al., 1997): pRiboTEX2. Para este fin, el primer paso fue generar la secuencia codificante de la proteína de fusión, para lo cual se clonó la secuencia codificante de profilina el vector de pmCherry en fase con la secuencia codificante para mCherry. Se utilizaron los sitios para *Bgl* II y *Eco* RI del sitio múltiple de clonación de pmCherry. La secuencia codificante de la proteína construida (mCherry-profilina) codifica para mCherry en el extremo amino (236 aminoácidos), seguida de cinco aminoácidos provenientes del sitio múltiple de clonación y la secuencia codificante de profilina (149 aminoácidos) (Figura 24A). Posteriormente, mCherry-profilina fue clonada en pRiboTEX2 en los sitios para *Bam* HI y *Eco* RI del sitio múltiple de clonación (Figura 24B). Por último, se clonó la secuencia de mCherry en pRiboTEX2 para utilizar el vector como control de localización subcelular. La secuencia de mCherry se obtuvo a partir del vector pmCherry vacío, agregándole un codón de parada en los últimos tres nucleótidos. Se utilizaron los sitios para *Bam* HI y *Eco* RI del sitio múltiple de clonación de pRiboTEX2 (Figura 24C). La integridad de los vectores recombinantes obtenidos fue confirmada por secuenciación.



11.2. Construcción de vectores de expresión para *E. coli*.

Para la expresión y purificación de profilina recombinante, se clonó la secuencia codificante de profilina en dos vectores de expresión en *E. coli*: pGEX4T1 y pMALc2x. Estos vectores están diseñados para expresar proteínas fusionadas en el extremo amino con la glutatión S-transferasa (GST) y la con la proteína de unión a maltosa (MBP), respectivamente. Estas etiquetas permiten la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad por glutatión (GST) o amilosa (MBP). La secuencia codificante de profilina fue clonada en fase con las etiquetas en los sitios para *Bam* HI y *Sal* I de los sitios múltiples de clonación de los vectores en fase con las etiquetas correspondientes (Figura 25). La secuencia de la fusión a GST codifica para la etiqueta en el extremo amino (224 aminoácidos), seguida de 2 aminoácidos provenientes del sitio múltiple de clonación y la secuencia codificante de profilina (150 aminoácidos). La arquitectura de la fusión a MBP es la misma, con excepción del extremo amino en el que se encuentra la etiqueta MBP (391 aminoácidos). La integridad de los vectores recombinantes obtenidos fue confirmada por secuenciación.



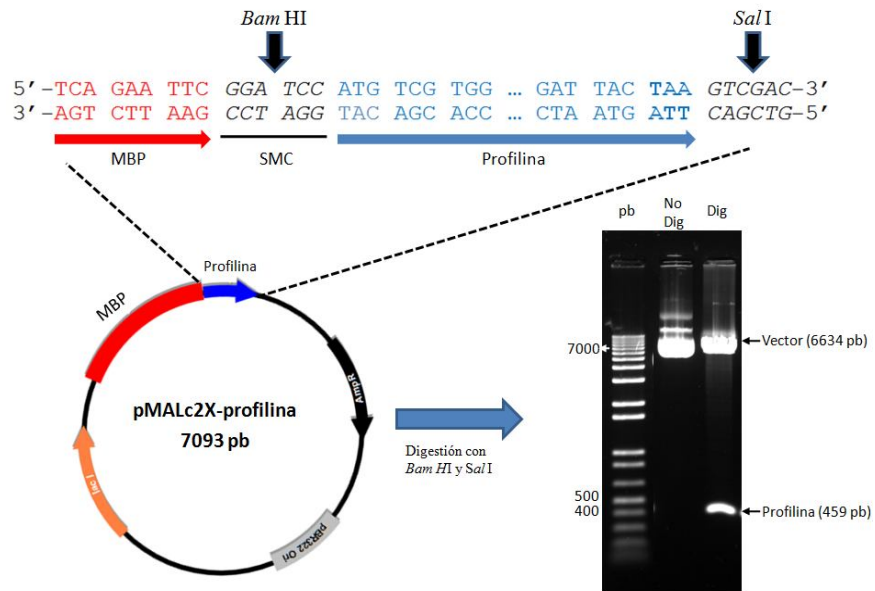


Figura 25. Construcción de vectores recombinantes para la expresión de profilina en *E. coli*. Se muestran los sitios de restricción donde se clonaron las secuencias codificantes para cada una de las proteínas, los mapas de los vectores recombinantes y geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio de los plásmidos super-enrollados (No Dig) y digeridos con las enzimas usadas para clonar los insertos (Dig).