



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
(Biología experimental)

**Caracterización de la distribución de especies de actina en
epimastigotes de *Trypanosoma cruzi***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Alfredo Cárdenas Rivera

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Ana María Cevallos Gaos
Instituto de investigaciones biomédicas

COMITÉ TUTORAL: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Instituto de investigaciones biomédicas
Dra. Rebeca Georgina Manning Cela
CINVESTAV - IPN

MÉXICO, D.F. Marzo, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de mayo del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CÁRDENAS RIVERA ALFREDO** con número de cuenta **51345174-0** con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES DE ACTINA EN EPIMASTIGOTES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS**:

Presidente:	Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez
Vocal:	Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez
Secretario:	Dr. Raúl José Bobes Ruiz
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dr. Abraham Landa Piedra

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de junio del 2015.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Agradezco el apoyo otorgado para la realización de esta tesis al Posgrado en ciencias biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la beca de CONACYT.

También agradezco el financiamiento otorgado a la realización de la presente tesis, en el marco del proyecto de PAPIIT número IN207112 titulado “Análisis de isovariantes de actina en el núcleo y su participación en complejos de transcripción por polimerasas I, II y III en *Trypanosoma cruzi*”

Así mismo agradezco a mi comité tutorial integrado por:

Dra. Ana María Cevallos Gaos

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

Agradecimientos personales

A Dios, por ser mi calma en los momentos difíciles, por brindarme cada día la oportunidad de corregir mis errores y aprender, y por poner en mi camino personas maravillosas.

A mis padres, a Orializ, mi madre, que con infinito amor y ternura me enseñó con ejemplo el valor de la constancia y trabajo duro, la fortaleza ante la adversidad y el perdón; a Adrián, mi padre quien a su estilo, trato de hacerme un mejor hombre cada día.

A mis hermanos, compañeros de juegos y travesuras, a Lorena, Adriana, Carla y Alejandro, quienes me enseñaron que el valor no es la falta de miedo, sino enfrentarlo; siempre serán un ejemplo a seguir.

A mis sobrinos Ximena, Santiago, Briana y Regina por llenar de alegría mis días.

A Tania, por ser parte importante de mi vida, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad, sobre todo por su paciencia y amor incondicional.

A Julio, por sus consejos, apoyo y ayuda, por brindarme su amistad sincera, por su calidad de persona y su humildad, por guiarme en el camino de la ciencia y mostrarme que la ciencia es tan apasionante como divertida.

Al Grupo de investigación de inmunología, en especial a Paola, Dra. Irmia, Nirk, Saul, Jose Luis U., Rodolfo y Dr. Jorge quienes me orientaron, alentaron y apoyaron en el camino de la ciencia.

A la familia Garrido Garduño, a Don Ricardo, Doña Berta, y Yuri, quienes me abrieron las puertas de su casa y sus corazones.

Al Dr. José “Pepito” Basurco y su hermosa familia, Sra. Aura, Fernanda, José, Alessandra y Teresita por permitirme ser parte de su familia.

Al Dr. Alejandro Casas Fernández por su confianza, su apoyo invaluable, y su gran calidad de persona.

A mi tutora, Dra Ana María por el tiempo dedicado a la realización del proyecto y el conocimiento compartido.

A Andrea, Ernesto y Felipe, no solo por ser mis compañeros de laboratorio, sino también mis amigos.

A la Ms Cs Karla López Pacheco por su apoyo técnico y acertados comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

A la Dra. Tania Garrido Garduño, la Dra Rocio del Carmen Navarro Olmos, al Dr. Julio E. Valdivia Silva y al Dr. Saul Perez Montaña por las críticas y consejos durante la elaboración del manuscrito y el análisis de los resultados.

A Miguel Tápia Rodríguez de la unidad de microscopía del Instituto de investigaciones biomédicas, por el apoyo técnico y asesoramiento en la toma de microfotografías confocales.

A Lluvia, Nataly, Erick, Olivia nuestros “buenos vecinos” de laboratorio, por su apoyo, consejo y amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y el programa de posgrado que me dieron la oportunidad de hacer la Maestría en ciencias biológicas, al Dr. Roberto Hernández por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la técnico de laboratorio Ms Cs Juliana Herrera por proveernos siempre del material biológico, sin el que no se hubiera llevado a cabo esta tesis.

A Paola, Dulce, Carmen, Bere, Claudia, Lupi, Lili y Miguel por su amistad sincera, su apoyo, su tiempo y las alegrías compartidas.

A la Dra. María Del Coro Arizmendi Arriaga, Lilia Espinosa, Dr. Armando Rodríguez, Patricia Oliva y Lilia Jiménez, un excelente grupo de personas quienes siempre buscan la mejor forma de apoyar a los alumnos de posgrado, su trabajo es insuperable, quedo profundamente agradecido.

A la Ms Cs Cristina Parada Colín y especialmente a la Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera por las enseñanzas y la invaluable ayuda brindada durante la estandarización y realización de los ensayos de electroforesis en dos dimensiones.

A la Biol. Olivia Alicia Reynoso Ducoing por permitirme realizar, bajo su tutela y apoyo, los controles de los ensayos de electroforesis en dos dimensiones y también por enseñarme con paciencia y claridad, también agradezco al Dr. Javier Ambrosio Hernández por permitirme realizar dichos ensayos en su laboratorio.

A Karl Sagan y a Stephen J. Gould por enseñarnos a hacer ciencia.

Dedicatoria

A mi familia, los amo

I. ÍNDICE

I. Índice	7
II. Lista de figuras y cuadros	9
III. Resumen.....	10
IV. Abstract	11
V. Introducción.....	12
VI. Antecedentes directos	20
VII. Objetivos	22
1. Objetivo general	22
2. Objetivos específicos	22
VIII. Metodología	23
1. Cultivo de epimastigotes	23
2. Lisado completo de epimastigotes	23
3. Anticuerpos	23
4. Fraccionamiento celular	25
a. Con NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic extraction reagents - Thermo Scientific (Cat# 78833)	25
b. Con Nonidet P-40 al 0.5%	25
5. Desalado de la muestra (preparación de las muestras para la electroforesis de dos dimensiones)	26
6. Concentración de la muestra	26
7. Electroforesis: Primera dimensión	26
8. Electroforesis: Segunda dimensión	27
9. Western blot (WB)	27
10. Inmunofluorescencia	27
IX. RESULTADOS.....	28
1. Selección de marcadores para fracciones citoplasmáticos y nucleares de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>.	28
2. Caracterización de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con NE-PER™	32

3. Caracterización de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con Nonidet P-40 0.5%	37
4. Distribución de las especies de actina en las fracciones obtenidas con Nonidet P-40 al 0.5%.	49
X. Discusión	52
XI. Conclusión	56
XII. Bibliografía.....	57
XIII. ANEXOS.....	65
XIV. Abreviaturas	71

II. LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1:	Análisis de los marcadores citoplasmáticos y nucleares en lisados completos de epimastigotes	30
Figura 2:	Epifluorescencia de epimastigotes completos con anti-EF1a y con anti-Histona 3	30
Figura 3:	Comportamiento de los marcadores citoplasmáticos y nucleares en el fraccionamiento celular con NE-PER	34
Figura 4:	Fraccionamiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con kit comercial NE-PER	35
Figura 5:	Lisis completa de parásitos con reactivo CER-II	36
Figura 6:	Comportamiento de los marcadores citoplasmáticos y nucleares en el fraccionamiento celular con Nonidet P40 0.5%	40
Figura 7:	Fraccionamiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con Nonidet P-40 0.5%	41
Figura 8:	Ensayo de purificación de núcleos con Percoll al 35% con sacarosa al 0.75 M	42
Figura 9:	Ensayo de purificación de núcleos sacarosa al 0.8 M	43
Figura 10:	Epifluorescencia con anti-EF1α de la fracción nuclear de epimastigotes obtenidos por el fraccionamiento celular con Nonidet P-40	44
Figura 11:	Epifluorescencia de fracción nuclear (enriquecido núcleo-kinetoplasto-flagelar)	45
Figura 12:	Microscopia confocal de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
Figura 13:	Microscopia confocal de fracción nuclear obtenida por fraccionamiento con Nonidet P-40	48
Figura 14:	Electroforesis de doble dimensión de epimastigotes, fracción citoplasmática y fracción nuclear	50
Figura 15:	Especies de actina reconocidos en lisado total, fracción citoplasmática y fracción nuclear de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	51

III. RESUMEN

Actina es una de las proteínas más abundantes en metazoarios y está relacionada a un diverso número de funciones tanto en el citoplasma como en el núcleo. Estas funciones están relacionadas con la expresión de diferentes isoformas de actina. Cada isoforma presenta localizaciones específicas en la célula, y un patrón de expresión distinto durante el desarrollo de los organismos. La regulación fina en el funcionamiento de dichas isoformas está dada por las modificaciones postraduccionales. La combinación de una isoforma de actina y sus modificaciones postraduccionales se denominan "especies de actina". El genoma de *Trypanosoma cruzi* tiene tres secuencias polimórficas que codifican para una misma forma de actina convencional (llamada actina 1), y adicionalmente otros 3 loci que codifican para otras formas distintas de actina convencional. Con ayuda de un suero policlonal desarrollado en nuestro laboratorio, observamos en ensayos de electroforesis de doble dimensión la expresión de distintas especies de actina 1 durante el desarrollo del ciclo de vida del parásito, pero hasta el momento no hay trabajos que demuestren que estas especies de actina tengan una distribución sub-celular específica. En este trabajo tratamos de identificar un patrón de distribución sub-celular específico de las especies de actina de *T. cruzi* que permita direccionar el estudio de sus funciones. Con el uso de técnicas de fraccionamiento celular con Nonidet P-40 y separación de proteínas en electroforesis de doble dimensión observamos un mayor número de especies a las previamente reportadas. Encontramos también, que las especies más abundantes de actina se encuentran distribuidas uniformemente tanto en fracciones enriquecidas para proteínas citoplasmáticas como para fracciones enriquecidas para proteínas núcleo-kinetoplasto-flagelares. Adicionalmente, identificamos la presencia de dos especies de actina básicas enriquecidas en la fracción citoplasmática y una especie ácida enriquecida en extractos núcleo-kinetoplasto-flagelares, que no habían sido identificadas en lisados de parásitos completos. Los resultados sugieren la presencia de especies de actina compartimento específicas en epimastigotes de *T. cruzi*, que potencialmente puedan estar comprometidas con funciones especializadas en dichos compartimentos.

IV. ABSTRACT

Actin is one of the most abundant proteins in metazoans and is related to a large number of functions in the cytoplasm and the nucleus. These functions are related with the expression of different actin isoform. Each isoform has specific locations in the cell, and a pattern of expression during development of different organisms. The functions of actin are tightly regulated by posttranslational modifications. The combination of actin isoform and posttranslational modifications are termed "species of actin". The genome of *T. cruzi* have tree polymorphic sequence that codify for the same form of "conventional" actin (called actin 1), and additionally other three loci encoding other forms, different of conventional actin. Using a polyclonal serum developed in our laboratory, we identified, in two dimensions electrophoretic assay, the expression of different species of actin 1 during the development life cycle of the parasite; but so far no studies that demonstrate that these species of actin have a specific sub-cellular distribution. In this work we tried to identify a pattern of sub-cellular distribution of the *T. cruzi* actin species that allows direct the study of their functions. Using cellular fractionation techniques with Nonidet P-40 and separation of proteins in electrophoresis two dimensions, we observed a greater number of species to those previously reported, the most species of actin are distributed in both protein fraction, cytoplasmic fraction and nucleus-kinetoplast-flagellum fraction, interestingly we identified the presence of two additional basic species exclusively in the cytoplasmic fraction and a separate, acidic species in the nucleus-kinetoplast-flagellum fraction, that they were not identified in lysates of whole parasites. The results suggest that a small number of species of actin is enriched in different compartments of the parasite, suggesting a cellular sub-species distribution of actin in epimastigotes of *T. cruzi* that can potentially be committed to specialized functions in these compartments.

V. INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

El *Trypanosoma cruzi*, protista hemoflagelado de divergencia temprana, es el agente causal de la tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas que afecta a más de 8 millones de personas en Latinoamérica (Zuma et al., 2014) por lo que es considerado un importante problema endémico y socioeconómico (Kirchhoff, 2011). Podemos distinguir dos fases en la enfermedad de Chagas, una fase aguda y otra crónica. La fase aguda tiene una duración de semanas a meses y es asintomática o subclínica, lo que dificulta el diagnóstico oportuno y su tratamiento precoz (Murcia et al., 2013). La fase crónica, que continua a la fase aguda, tiene una duración de años y puede llegar a ser letal, especialmente cuando afecta el corazón (Murcia et al., 2013; Zingales et al., 2012). Actualmente esta enfermedad es incurable, en la fase crónica (García-Bournissen et al., 2011), causando más de 10,000 muertes al año como consecuencia de dicha fase (Kirchhoff, 2011).

CICLO DE VIDA DE TRYPANOSOMA CRUZI

Este parásito presenta un ciclo de vida enzoónico y digénico que alterna entre un hospedero invertebrado, insecto perteneciente a la subfamilia Triatominae, y un hospedero vertebrado, que incluye al ser humano (De Souza, 1984; Kirchhoff, 2011). A lo largo de su ciclo presenta 3 estadios morfológicos principales: el amastigote, el tripomastigote y el epimastigote. El estadio de amastigote es una forma no flagelada del parásito y con capacidad replicativa. El estadio de tripomastigote es una forma flagelada pero no replicativa del parásito. El estadio de epimastigote es una forma flagelada y replicativa (Murcia et al., 2013).

Su ciclo biológico (ver ILUSTRACIÓN 1) inicia cuando el insecto vector hematófago pica al hospedero vertebrado y deja sus deposiciones cercanas al sitio de la picadura. Las deposiciones contienen los tripomastigotes metacíclicos, que son las formas infectantes en mamíferos. Los tripomastigotes ingresan al cuerpo de los mamíferos a través de la lesión en la piel dejada por la picadura del insecto vector. El tripomastigote tiene la capacidad de infectar cualquier tipo de célula de mamífero. Al infectar las células de los mamíferos, los tripomastigotes se transforman al estadio replicativo de amastigote. El amastigote presenta varios ciclos replicativos dentro de la célula de mamífero antes de liberarse al espacio extracelular como tripomastigote sanguíneo. En este punto, el tripomastigote sanguíneo puede infectar a más células del hospedero mamífero o a un nuevo insecto vector. El insecto vector se infecta al succionar sangre infectada del hospedero mamífero. Dentro del insecto vector, los parásitos cambian a un estadio replicativo de epimastigote. En cuanto los

epimastigotes alcanzan la cloaca del insecto vector, cambian nuevamente de estadio a tripomastigote metacíclico, cerrando de esta forma su ciclo biológico (De Souza, 1984; Moncayo et al., 2009; Rassi et al., 2010).

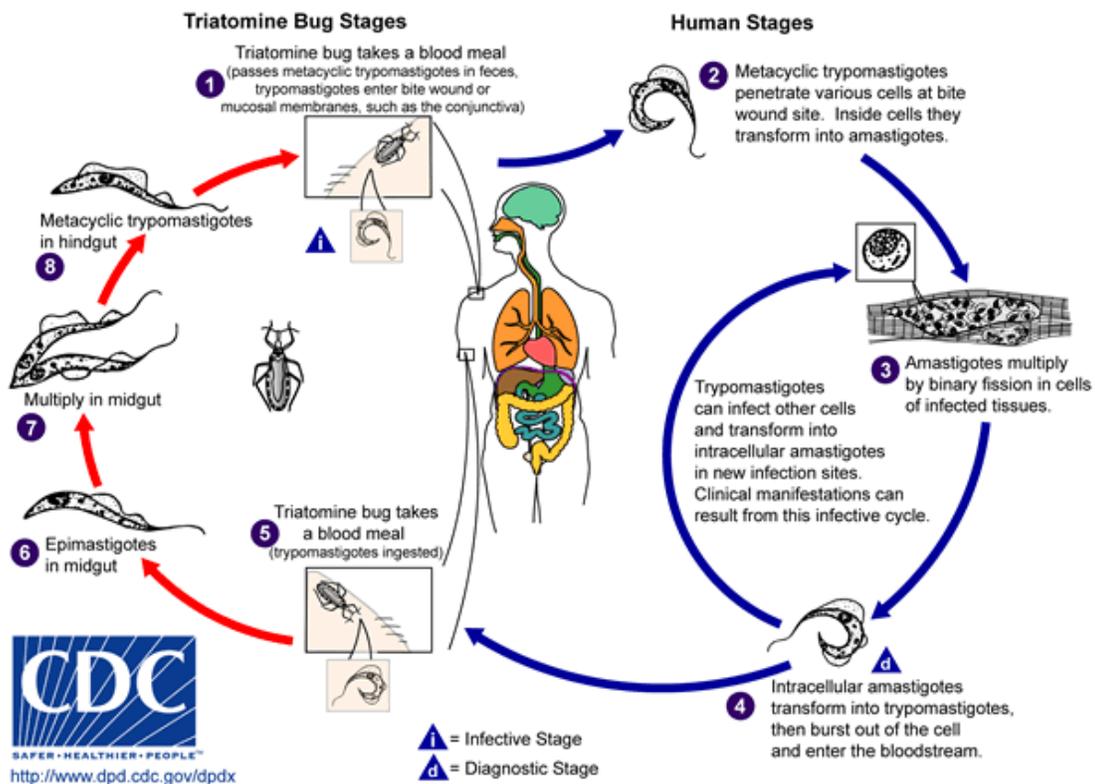


Ilustración 1 Ciclo de vida del *Trypanosoma Cruzi*

Los tripomastigotes (1), presentes en las heces del insecto vector infectado, ingresan al cuerpo del hospedero mamífero por la herida hecha por la picadura del insecto. Los tripomastigotes metacíclicos (2) infectan las células de los mamíferos y cambian a un estadio replicativo de amastigote (3). Los parásitos pueden al salir de las células de mamífero infectada cambiar a un estadio de tripomastigote sanguíneo, que puede infectar más células del hospedero mamífero o a un insecto vector (5). El parásito dentro del insecto vector cambia al estadio de epimastigote (6), que es una forma replicativa (7). El parásito al llegar a la cloaca del insecto vector, cambia a al estadio de tripomastigote metacíclico (8), estadio infectante para mamíferos, cerrando así el ciclo. Tomado de la página oficial de la CDC <http://s www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

BIOLOGÍA CELULAR DEL *TRYPANOSOMA CRUZI*

T. cruzi pertenece al grupo de tripanosomátidos, junto a *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei*. Los tripanosomátidos presentan estructuras celulares características de este grupo que las distinguen del resto de células de metazoarios, que son: el corset sub-pelicular, el bastón paraflagelar (Field et al., 2009), una mitocondria única, el kinetoplasto (que corresponde al DNA mitocondrial altamente

compactado) (Cavalcanti et al., 2009; Minocha et al., 2011), y un núcleo que se caracteriza por no desensamblar su envoltura nuclear durante la división celular (Elias et al., 2007; Zuma et al., 2014). El corset sub-pelicular es una estructura formada por haces de polímeros de tubulina llamados microtúbulos, subyacente a la cara interna de la membrana citoplasmática. La única porción de membrana citoplasmática no cubierta por el corset sub-pelicular es el bolsillo flagelar. El corset sub-pelicular brinda una resistencia particular a la membrana citoplasmática, que se hace evidente durante los procesos de fraccionamiento celular (De Souza & Da Cunha-e-Silva, 2003). El bolsillo flagelar es una invaginación de la membrana citoplasmática (Field et al., 2009) (ver ILUSTRACIÓN 2). El bolsillo flagelar está relacionado a procesos celulares como la endocitosis y exocitosis (Nolan et al., 2008). Del bolsillo flagelar emerge el flagelo. El flagelo es un organelo multifuncional único, es decir los parásitos son monoflagelados, que tiene un papel crítico en la movilidad, quimiotaxis, señalización celular e invasión de las células huésped (Friedberg, 2006). El flagelo está formado por dos estructuras: el bastón paraflagelar y el axonema (ver ILUSTRACIÓN 2). El bastón paraflagelar es una estructura proteínica exclusiva de los tripanosomátidos y corre paralela al axonema (Ralston et al., 2009). El axonema es una estructura altamente conservada de microtúbulos, organizada en el patrón clásico 9+2 y es importante en la movilidad del parásito. El flagelo nace de una estructura de nueve tripletes de microtúbulos en forma de barril llamada cuerpo basal, análoga al centriolo de los metazoarios (ver ILUSTRACIÓN 2) (Ralston et al., 2009; Rocha et al., 2006). Una vez que emerge por el bolsillo flagelar corre contiguo al cuerpo celular del parásito, anclándose a lo largo de su trayectoria a la membrana citoplasmática y el corset sub-pelicular subyacente por una estructura especializada llamada FAZ (zona de anclaje flagelar) (Ralston et al., 2009). El kinetoplasto es otra de las estructuras exclusivas de tripanosomátidos y está formada por los maxicírculos y minicírculos de DNA mitocondrial altamente condensado (Cavalcanti et al., 2009; Minocha et al., 2011). El kinetoplasto está fuertemente unido al cuerpo basal por el complejo de anclaje tripartito (TAC) (ver ILUSTRACIÓN 2). El TAC es una red de filamentos, de naturaleza desconocida, que se extiende de la parte más proximal del cuerpo basal a la membrana externa de la mitocondria (primera parte), de la membrana externa a la interna de la mitocondria (segunda parte), y de está al kinetoplasto (tercera parte)(Gull, 1999; Ralston et al., 2009).

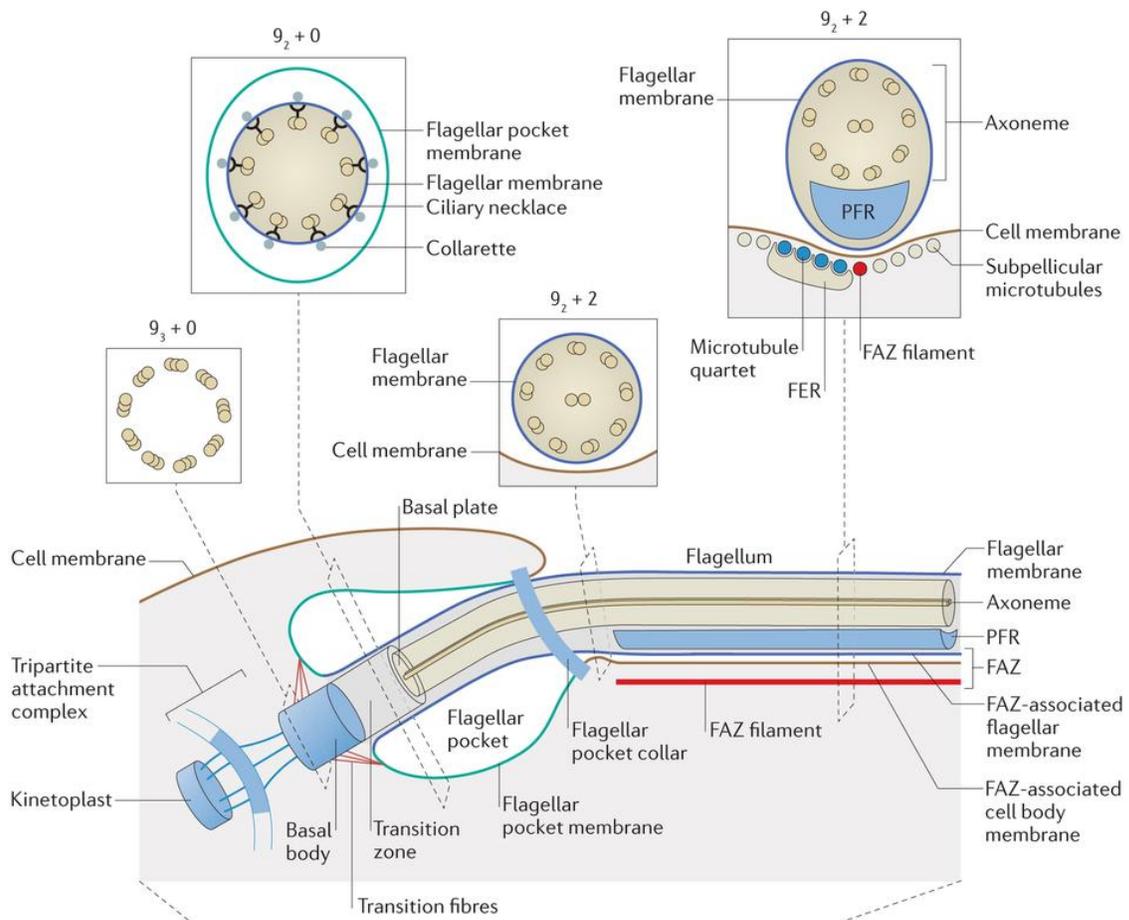


Ilustración 2: Estructuras relacionadas al flagelo en tripanosomátidos

El flagelo se origina del cuerpo basal (*basal body*), como una estructura de 9 dobletes periféricos de tubulina ($9+0$). Al emerger del fondo del bolsillo flagelar, el flagelo es recubierto por la membrana citoplasmática, a la cual queda relacionada por las proteínas del “collar ciliar” (*ciliary necklace*) y el collarete (*collarete*). Por encima de la placa basal (*Basal plate*), el flagelo presenta su estructura clásica $9+2$ (9 dobletes periféricos y un doblete central). El bastón paraflagelar (PFR) y los filamentos de la zona de anclaje flagelar (FAZ) acompañan al flagelo una vez que este sale del bolsillo. EL complejo de anclaje tripartito (*Tripartite attachment complex*) está formado por las proteínas que relacionan el kinetoplasto (*kinetoplast*) con la membrana mitocondrial interna, las proteínas que atraviesan la membrana mitocondrial interna y externa, y finalmente las proteínas que van de la membrana externa mitocondrial al cuerpo basal. Tomado de Langousis, G., & Hill, K. L. (2014). *Motility and more: the flagellum of Trypanosoma brucei*. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(7), 505–18. doi:10.1038/nrmicro3274

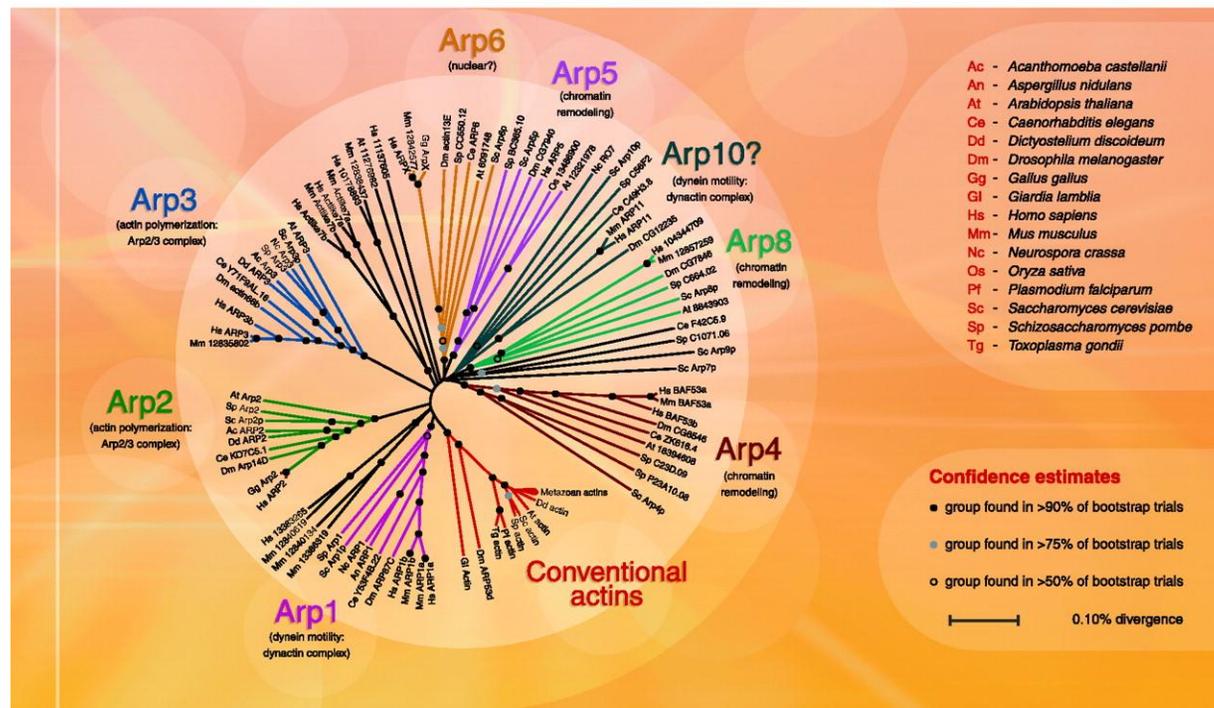
ACTINA CONVENCIONAL

Actina “convencional” es una proteína fuertemente conservada y es la proteína más abundante en metazoarios. Actina está relacionada a un diverso número de funciones desde la endocitosis-exocitosis, diapédesis, mantenimiento de la forma celular, transporte intracelular y la polarización celular en el citoplasma hasta la remodelación de la cromatina y la transcripción en el núcleo (Chaponnier et al., 2004;

Goodson et al., 2002; Hofmann, 2009; Perrin et al., 2010; Rubenstein et al., 2005). Actina “convencional” es una subfamilia de la “familia de actinas” (Goodson et al., 2002), en las cuales también se incluyen a las proteínas relacionadas a actinas (ver Ilustración 3) (Goodson et al., 2002). Las proteínas relacionadas a actina (ARPs) se caracterizan por tener un plegamiento parecido al de actina convencional y conservar el dominio común ATPasico característico de la familia de actinas (Boyeret al., 2000). Las ARPs se distinguen de actina convencional por inserciones y deleciones específicas que permiten agruparlas en al menos 10 grupos diferentes (ARP1-10) (ver Ilustración 3) (Boyer et al., 2000; Goodson et al., 2002). Las ARPs son importantes para procesos celulares altamente conservados a lo largo de la evolución (Boyer et al., 2000; Goodson et al., 2002). Se ha reconocido otro grupo de proteínas similares a actina que no son ARPs ni actinas convencionales. Estas proteínas similares a actina han sido identificadas tanto en bacterias, como protistas y mamíferos (Carballido-López, 2006; Chadwick et al., 1999; Gordon et al., 2010; Hirono et al., 2003; Kato-Minoura et al., 2003; Oh et al., 2013). A diferencia de las ARPs, estas proteínas no parecen estar distribuidas ampliamente a lo largo de los diferentes phyla. Aunque frecuentemente se han usado indistintamente, para evitar confusiones, Gordon and Sibley propusieron limitar el uso del término “proteínas similares a actina” (Actin-like proteins, Alp) a aquellas proteínas con similitud de secuencia a actina que no pertenecen a ninguno de los tipos de las ARPs convencionales y que están limitadas a grupos taxonómicos específicos (Gordon et al., 2005).

La actina es una proteína globular, dividida en dos grandes dominios mediante una hendidura profunda superior y otra hendidura inferior. Al fondo de la hendidura superior se halla el sitio activo de unión a ATP. El intercambio de ATP a ADP es un factor de regulación de polimerización de los filamentos de actina, llamados microfilamentos. La hendidura inferior es pequeña y también se la ha denominado “hendidura hidrofóbica” por sus características bioquímicas. La hendidura inferior es el principal sitio o “target” de interacción con las proteínas que modulan la actividad de actina como las ABPs (proteínas de unión a actina) (Dominguez et al., 2011). Las hendiduras separan tridimensionalmente la proteína de actina en dos dominios asimétricos: el dominio “mayor” y el dominio “menor”. En el dominio mayor se encuentran los extremos N-terminal y C-terminal (Oda et al., 2009). Los dominios se unen a través de la región “bisagra” formada por los aminoácidos de las posiciones 141-142 y 336-337. Los dominios giran uno sobre el otro, a manera de tijera, tomando como eje la región visagra. El movimiento de los dominios está relacionado al intercambio de ADP por ATP al fondo de la hendidura superior, en presencia de iones Ca^{2+} . El intercambio de ADP por ATP favorece la polimerización de actina (Oda et al., 2009). Actina, como otras proteínas en eucariontes, es expresada como distintas isoformas (Perrin et al., 2010). Las isoformas de actina se originan por la expresión de diferentes genes que codifican para versiones similares de actina. Las isoformas de

actina están relacionadas a funciones especializadas en localizaciones intracelulares específicas (Hofmann, 2009; North et al., 1994; Perrin et al., 2010; Terman et al., 2013). La expresión de las isoformas de actina también está relacionado a las etapas de desarrollo de los organismos (Díaz-Camino et al., 2005; Jiang et al., 2002; Kuroda, 1985). En mamíferos, las isoformas de actina se han agrupado en 5 grupos: α -actina cardiaca, α -actina de músculo liso, α -actina de músculo esquelético, β -actina y γ -actina. Las represiones de algunas isoformas de actina han resultado ser letales en modelos murinos, como la delección de α -actina cardiaca, α -actina esquelética, β -actina (Perrin et al., 2010). En estos modelos experimentales se observó sobre-expresión de las otras isoformas de actina que fueron insuficientes para suplir las funciones de la isoforma deletada (Perrin et al., 2010). Adicionalmente la actina, como otras proteínas, sufre modificaciones postraduccionales (PTMs). Las PTMs comprenden tanto la eliminación de aminoácidos de la cadena polipeptídica de la proteína, como la incorporación de grupos funcionales en forma de monómeros o polímeros (Terman et al., 2013). Las PTMs ejercen un control fino en la dinámica de actina por modificación de las fuerzas intermoleculares que aumentan o disminuyen la afinidad a proteínas de unión a actina (ABPs) (Terman et al., 2013). Las ABPs son un grupo de proteínas que se une a actina y regulan las funciones en las que está involucrada actina. Una de las PTMs más frecuentes de actina es la eliminación de sus dos o tres primeros aminoácidos y la acetilación del nuevo extremo N-terminal (Terman et al., 2013). Otras modificaciones también descritas para actina son la ADP-ribosilación, la arginilación, la fosforilación, la metilación y la ubiquitinización (Terman et al., 2013). Algunas PTMs de la actina se relacionan a su relocalización intracelular, como la arginilación de actina que promueve su traslocación hacia la lamella, borde líder de la célula en movimiento, (Karakozova et al., 2006) o la sumoilación de actina que promueve la permanencia de la β -actina (Hofmann et al., 2009) en el núcleo (Dopie et al., 2012). La relocalización de proteínas por PTMs no es exclusiva de actina, sino muy por el contrario, es un mecanismo ampliamente utilizado por la célula (Sakurai & Utsumi, 2006; Solito et al., 2006), en vías de señalización (Filtz et al., 2012; Kim et al., 2012), o mecanismos celulares como la apoptosis (Puyal et al., 2013), donde interesantemente un extremo de actina miristoilado es translocado a la mitocondria y está involucrado en la vía de apoptosis dependiente de caspasas (Utsumi et al., 2003). La combinación de una isoforma específica de actina con sus distintas PTMs se denomina en conjunto “especies” de actina (Schlüter et al., 2009), este término es sumamente útil para definir las formas de actina cuya naturaleza bioquímica aún no ha sido determinada por espectrometría de masas.



Holly V. Goodson and William F. Hawse

© Journal of Cell Science 2002 (115, pp.2619-2622)

Ilustración 3: Familia de actinas

Análisis filogenético de la familia de actina en eucariontes. La familia de actinas está formada por lo menos por 9 subfamilias: "Actina convencional" ampliamente estudiada y relacionada a funciones tanto en el citoplasma como en el núcleo, ARP1 y ARP10 relacionado a complejos dinámicos de dineína; ARP2 y ARP3 involucrados en la regulación de la formación de microfilamentos; ARP4, ARP5 y ARP8 comprometido con la remodelación de cromatina; ARP6 de ubicación nuclear pero cuya función no está completamente dilucidada. Tomado de Goodson, H. V & Hawse, W.F., 2002. Molecular evolution of the actin family. Journal of cell science, 115, pp.2619-2622.

ACTINA EN TRIPANOSOMÁTIDOS

Las funciones de la actina en tripanosomátidos son poco conocidas. No hay estudios sobre las funciones de actina en *T. cruzi* ni en *L. major*. En *T. brucei*, la única función a la que ha sido relacionada es a endocitosis (García-Salcedo et al., 2004), y aparentemente no está involucrada en los procesos de exocitosis (Nolan et al., 2008). Interesantemente, se ha visto que la represión de actina es letal en formas sanguíneas de *T. brucei*, pero no es así para las formas procíclicas (García-Salcedo et al., 2004). Esto sugiere una especialización de las funciones de la actina estadio-específica.

Es ampliamente aceptado que las funciones de actina se relacionan a localizaciones intracelulares específicas (Galletta et al., 2010; Gandhi et al., 2008; Gieni et al., 2009; Gomez et al., 2014; Rubenstein et al., 2005). Hay evidencias experimentales que sugieren que esta característica también está conservada en tripanosomátidos (García-Salcedo et al., 2004). En *Leishmania donovani*, organismo estrechamente emparentado con *T. cruzi*, se sugiere la presencia de la actina en núcleo, kinetoplasto y flágeno (Sahasrabudde et al., 2004). Estos resultados fueron obtenidos por técnicas de inmunofluorescencia confocal y microscopía electrónica de inmuno-oro en preparaciones de núcleos y citoesqueleto (Sahasrabudde et al., 2004). En *T. brucei* se ha identificado la presencia de actina relacionada al bolsillo flagelar durante la endocitosis (García-Salcedo et al., 2004). Los reportes de las localizaciones de la actina identificados por inmunofluorescencia de epimastigotes de *T. cruzi* no han sido homogéneos. Los primeros estudios de localización de actina en *T. cruzi* fueron hechos por de Souza et al. en 1983. De Souza describe una fuerte presencia de actina paralela al flagelo y una tenue señal en el cuerpo celular de epimastigotes de este parásito (De Souza et al., 1983). Este patrón es distinto al reportado por Mortara años después, quien utilizó el mismo antisuero de De Souza (De Souza et al., 1983) y purificado adicionalmente por afinidad con F-actina (forma de actina polimerizada, microfilamentos), muestra que la actina se distribuye más en el cuerpo del parásito que en el flagelo (Mortara, 1989). De Melo et al. en 2008 y Cevallos et al. en 2011 concuerdan con este hallazgo, pero adicionalmente De Melo sugiere que la actina tiene un patrón de distribución puntiforme distribuido homogéneamente en el cuerpo del parásito (De Melo et al., 2008), mientras que Cevallos observó una acumulación de actina cercana a la base del flagelo (Cevallos et al., 2011). Pese a la falta de consenso de la distribución subcelular de actina, todos los estudios confirman la presencia de actina de *T. cruzi* al menos en el cuerpo celular, el flagelo (paralela al axonema) y en una concentración importante cercana a la base flagelar; no se ha demostrado la presencia de la actina en kinetoplasto ni núcleo de *T. cruzi*. Esta variación podría ser un artefacto producto de diferentes métodos de preparación de las muestras (Schnell et al., 2012).

VI. ANTECEDENTES DIRECTOS

Nuestro laboratorio inició la caracterización de actina de *T. cruzi* identificando las secuencias codificadoras con ayuda de una sonda heteróloga para actina de *A. castellani*. Se identificaron 3 copias del gen de actina, dos en el haplotipo No-Esmeraldo y una en el haplotipo Esmeraldo (Cevallos et al., 2003). Las tres secuencias polimórficas, con cambios conservados, codifican para una proteína idéntica de 376 aminoácidos, con una similitud del 93% a actina de *T. brucei* (Cevallos et al., 2003). En el 2011 se generó un antisuero policlonal contra esta actina, lo que permitió demostrar su presencia en los tres estadios del parásito (epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes) tanto por ensayos de inmunolocalización como por ensayos de Western blot (WB) (Cevallos et al., 2011). Un resultado interesantemente fue la presencia de 5 especies de actina diferentes para cada estadio del parásito identificados por ensayos de electroforesis de doble dimensión (E2D) y WB. Las especies de actina, reconocidas en epimastigotes, tienen un punto isoeléctrico (pI) entre 4.5 a 5.0, más ácidos del punto teórico esperado 5.5 (Cevallos et al., 2011). Para descartar que la identificación de estas múltiples formas de actina sea por reconocimiento cruzado del antisuero (Cevallos et al., 2003), se hizo una búsqueda bioinformática de secuencias similares en el genoma de *T. cruzi*. Se identificaron un total de 12 loci que están anotados como proteínas de la familia de las actinas: 4 loci anotadas como actinas putativas (siendo uno de ellos el previamente caracterizado por nosotros), 5 loci anotados como Alps y 3 anotados como ARPs (ARP2, ARP3 y ARP6). Alineaciones de las secuencias proteínicas mostraron que son poco similares entre sí y poco similares con actina convencional (con identidades entre el 22 y el 51%). Un análisis filogenético identificó dos clados independientes, uno que contiene la actina convencional y otro que agrupa el resto de proteínas de la familia de las actinas (Cevallos et al., 2011) (ver Apéndice 1). Se valoró experimentalmente el reconocimiento cruzado de nuestro anticuerpo con las otras formas de actina. El trabajo de maestría de Josefina Mata Vadillo (Valdillo-Mata, 2009) demostró que nuestro antisuero no reconoce la forma recombinante de la proteína anotada como “actin-like 4”. El trabajo doctoral de Andrea Vizcaíno (paralelo al desarrollo de esta tesis) demostró que el anticuerpo tampoco reconoce a versiones recombinantes de actinas 2, 3 y 4 expresadas en *E. coli*. Estos estudios sugieren que las especies de actina de *T. cruzi*, reconocidas por el antisuero (Cevallos et al., 2003), son generadas por PTMs de actina 1 y no son debidas a un reconocimiento cruzado con las otras proteínas de la familia de las actinas.

Ya que algunas PTMs de la actina en eucariontes se han relacionado a localizaciones subcelulares específicas y que las localizaciones subcelulares están relacionadas directamente a las funciones en las que esta proteína está involucrada (Díaz-Camino et al., 2005; Huang et al., 1991; Jiang et al., 2002; Kuroda, 1985), nosotros esperamos

encontrar algunas diferencias en la distribución subcelular de las especies de actina 1 identificados en epimastigotes de *T. cruzi* (Cevallos et al., 2011). Iniciamos la caracterización con fracciones citoplasmáticas y nucleares porque el grupo de trabajo tiene especial interés en estudiar la biología molecular nuclear de este parásito.

VII. OBJETIVOS

1. **Objetivo general**

Determinar la distribución subcelular de las especies de actina en epimastigotes de *T. cruzi*.

2. **Objetivos específicos**

- Estandarizar una técnica de fraccionamiento celular que permita obtener fracciones citoplasmáticas y nucleares de epimastigotes de *T. cruzi*.
- Identificar las formas de actina presentes en extractos nucleares y citoplasmáticos de epimastigotes de *T. cruzi*.

VIII. METODOLOGÍA

1. Cultivo de epimastigotes

Epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL - Brener se mantuvieron en cultivo axénico (medio LIT suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino, 25 mg de Hemina, 10 mg de Estreptomicina y 10,000 UI de penicilina) a 27°C (Cevallos et al., 2003). Para mantenerlos siempre en fase exponencial, fueron resemebrados cada tercer día post-cultivo.

2. Lisado completo de epimastigotes

Para los ensayos de electroforesis de una sola dimensión se cosecharon 50×10^6 parásitos, en fase media logarítmica (tercer día post-cultivo), se lavaron en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, pH 7.4) y el pellet se lisó en 100 μL de SDS - *Sample Buffer* (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 25%, Azul de bromofenol 0.01%) a 92° C por 5 minutos (concentración final 0.5×10^6 parásitos/ μL). Cada carril se cargó 5×10^6 parásitos equivalente a 20 μg de proteínas. Para estudios de electroforesis de doble dimensión (E2D), los epimastigotes se lavaron tres veces en PBS, y luego se homogenizaron en una solución de lisis (Tris-base 60 mM, DTT 100 mM y SDS 2%) a una concentración de 0.5×10^6 parásitos/ μL . El lisado se sonicó 3 veces a ~30% en equipo MSE Soniprep 150 por 15 segundos (con intervalos de 45 segundos en hielo). Luego las muestras fueron desaladas (ver más adelante) antes de ser cargadas para el isoelectroenfoco - 1era dimensión.

3. Anticuerpos

Como marcadores de **fracción citoplasmática** se evaluaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo comercial anti-Factor de Elongación 1 α de *T. brucei* (EF1 α), clona CBP-KK1 – Millipore (cat# 05-235), el anticuerpo comercial anti-Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa de *Homo sapiens* (GAPDH) – GenTex (cat# GT239), el anticuerpo comercial anti-Fosfogliceratoquinasa de *T. brucei* (PGK)– Abcam (cat# ab89651), y un suero policlonal anti-Triosafosfato isomerasa (TIM) de *Giardia lamblia* (gentilmente donado por el Dr. Gabriel López del laboratorio del Dr. Horacio Reyes, INP-México). Como marcador de **fracción nuclear** se evaluó el anticuerpo comercial anti-Histona H3 de *H. sapiens* (H3)– Abcam (cat# ab1791) (ver Tabla 1).

TABLA 1 ANTICUERPOS PROBADOS COMO MARCADORES DE FRACCIONES CITOPLASMÁTICAS Y NUCLEARES

Nombre	Inmunógeno	Especie inmunógena	Aplicaciones	Especies reactivas	Tipo suero	Huésped	Marca. Fracc.	MW
Anti-EF1, clone CBP-KK1 – Millipore [cat# 05-235]	Crudo de proteínas obtenido por cromatografía de afinidad con calmodulina. Clona CBP – KK1.	<i>T. brucei.</i>	WB, IP.	Tripanosomátidos., Levaduras., Mamíferos.	Monoclonal	Ratón	Citoplasmática	50 kDa
Anti-Histone H3 antibody - Nuclear Loading Control and CHIP Grade - Abcam [cat# ab1791]	Péptido del aa 100 al c-terminal de Histona H3.3 - Acc.# NP_002098.	Homo sapiens.	IHC-Fr, CHIPseq, Dot Blot, Flow Cyt, IHC-P, Electron microscopy, ICC/IF, ChIP, IP, WB, ChIP/Chip, IHC – Wholemout, ICC.	<i>T. cruzi</i> , <i>Saccharomyces pombe</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cyanidioschyzon merolae</i> , <i>Xenopus laevis</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> .	Policlonal, purificado por afinidad inmunogénica	Conejo	Nuclear	17 kDa
Anti – triosephosphate isomerase - Lab. Dr. Horacio Reyes [G1TIM]	Proteína recombinante de triosephosphate isomerase.	<i>Giardia lamblia.</i>	WB	<i>G. lamblia.</i>	Policlonal (antisuero completo)	Ratón	Citoplasmática	27kDa
Anti-Trypanosoma brucei phosphoglycerate kinase antibody - Abcam [cat# ab89651]	Péptido sintético derivado del dominio C – terminal de la Fosfoglicerato cinasa.	<i>T. brucei.</i>	ICC/IF, ICC, WB	<i>T. brucei.</i>	Policlonal (antisuero completo)	Conejo	Citoplasmática	56 kDa 48 kDa
GAPDH antibody (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) - GenTex [cat# GT239]	Proteína recombinante del aa. 1 al 335 de GADPH. Acc.# AAF99678.	<i>Homo sapiens.</i>	ICC/IF, IHC-P, WB.	Humano, ratón, rata, <i>Drosophila</i> , Zebrafish, levadura.	Monoclonal	Ratón	Citoplasmática	39 kDa

Marca. Fracc.: Marcador de fracción citoplasmática o nuclear; MW: Peso molecular esperado de la proteína reconocida por el anticuerpo.

4. Fraccionamiento celular

a. Con NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic extraction reagents - *Thermo Scientific* (Cat# 78833)

Se siguieron las indicaciones del fabricante. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4°C. Brevemente, se tomaron 180×10^6 epimastigotes, en el tercer día de crecimiento, luego de ser lavados tres veces con PBS se resuspendieron en 193 μ L de amortiguador hipotónico CER-I con inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail 100X – *Sigma Aldrich* Cat#P8849), a una concentración final de 1X. Posteriormente se agregaron 10.58 μ L de CER-II (para producir la lisis de la membrana citoplasmática), se centrifugó y el sobrenadante (fracción citoplasmática) fue alicuotado y guardado a -70°C hasta su uso. El pellet se resuspendió en 193 μ L de NER con inhibidor de proteasas, a una concentración final de 1X. Se incubó en hielo por 40 minutos y luego se centrifugó a 16,000 x g a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se tomó como fracción nuclear soluble y el pellet final se resuspendió en 50 μ L de *Sample Buffer*.

b. Con Nonidet P-40 al 0.5%

Todos los procedimientos fueron realizados a 4° C. Al tercer día de cultivo, se tomaron 500×10^6 epimastigotes, luego de ser lavados en PBS, se resuspendió en 9.5 mL de amortiguador hipo-osmolar (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 3mM, MgCl₂ 2mM), se transfirió a Dounce Homogenizer 15 mL – Bellco y se agregó Nonidet P-40 (concentración final de 0.5%). Luego de 10 minutos en hielo, se bajó y subió el emboló del Dounce 10 veces (con Pestle B: Clereance 0.001-0.003”). Se confirmó por microscopía la disrupción de las membranas celulares y liberación de los núcleos. Se centrifugó a 1,000 x g, a 4° C por 15 minutos. El sobrenadante, fracción citoplasmática, se retiró, se desaló (ver método más adelante), se cuantificó la concentración de proteínas (en NanoDrop 1000-Thermo Scientific) y se precipitaron el equivalente de 125 μ g en TCA 10%. El pellet (fracción nuclear), se resuspendió en amortiguador hipo-osmolar, se homogenizó por sonicación, se desaló, se cuantificó la concentración de proteína y las proteínas se precipitaron con TCA 10% (en las mismas condiciones que se aplicaron a los lisados completos de epimastigotes).

Como un intento de purificar la fracción nuclear, disminuyendo los contaminantes como detritos celulares y flagelos, se probaron dos tipos diferentes de gradiente de densidad:

- 1) Sacarosa al 0.8M: El pellet (conteniendo los núcleos y flagelos) se colocó sobre un gradiente de densidad de sacarosa al 0.8 M (disuelta en amortiguador hipo-osmolar), se centrifugó a 1, 000 – 5,000 x g, a 4° C

por 15 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet, conteniendo los núcleos, fue recuperado.

- 2) Percoll al 35% /Sacarosa al 0.75 M: El pellet se colocó sobre una columna de Percoll al 35% - sacarosa al 0.75 M (disuelta en amortiguador hipo-osmolar), se centrifugó a 60, 000 x g, a 4° C por 30 minutos (Shapiro et al., 1982). El sobrenadante se descartó y el pellet, conteniendo los núcleos, fue recuperado.

5. Desalado de la muestra (preparación de las muestras para la electroforesis de dos dimensiones)

Para disminuir la cantidad de sales, sustancias tensoactivas (detergentes) y otros compuestos en la muestra que pudieran interferir con la primera dimensión (isoelectroenfoque), los extractos de células completas o fracciones celulares fueron filtrados en columnas *ilustra NAP-5 – GE Healthcare* (cat# 17-0853-02). Las columnas fueron previamente equilibradas con “amortiguador de fosfatos” (Na_2HPO_4 7.74 mM; NaH_2PO_4 2.26mM) y luego con “amortiguador de elución” (Na_2HPO_4 7.74 mM; NaH_2PO_4 2.26mM; CHAPS 2%), posteriormente se agregó la muestra a desalar. Se tomaron alícuotas de 500 μL por decantación y se cuantificó la concentración de proteínas en *NanoDrop 1000 Spectrophotometer – Thermo Scientific* a una absorbancia de 280 nm, para identificar la alícuota con mayor concentración de proteínas.

6. Concentración de la muestra

Para concentrar el equivalente a 125 μg de proteínas de la muestra (medidos en Nanodrop), se agregó deoxicolato (DOC) a una concentración final de 0.02% y ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 10%, se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 18,000 x g (4°C) por 10 min. , se descartó el sobrenadante y se realizaron dos ciclos de lavado con acetona 100% (-20°C). Finalmente el pellet de proteínas precipitadas se solubilizó en “amortiguador de rehidratación” (150 μL de *DeStreak Rehydration Solution – GE Healthcare* cat# 17-6003-19, 1.5 μL de *IPG buffer – GE Healthcare* cat# 17-6000-86) y DTT a una concentración final de 0.2% (Técnica implementada en el laboratorio de Dra. Clara I. Espítia Pinzón).

7. Electroforesis: Primera dimensión

Tiras Immobiline DryStrip Gels pH 4-7, 7 cm – GE Healthcare (cat# 17-6001-10) se hidrataron con 125 μL de las proteínas solubilizadas en “amortiguador de rehidratación” (antes descrito) se incubaron a temperatura ambiente por 16 horas. El enfoque se hizo en un equipo *Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit – GE*

Healthcare (cat# 11-0033-64), ajustado previamente a 20°C, en diferentes pasos: gradiente 100 V, 150 V/h; paso 300 V, 200 V/h; gradiente 1000V, 300 V/h, gradiente 5000 V, 4500 V/h; paso 5000 V, 20000 V/h.

8. Electroforesis: Segunda dimensión

Las tiras se equilibraron en “Amortiguador de equilibrio” (Urea 6 M, SDS 2%, Glicerol 20%, Tris-HCl pH 8.8 50 mM, DTT 2%), y luego se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% de 1.5 mm de grosor, en equipo *Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis Sytem – Hoefer* (cat# 684020) a 40 mA por gel.

9. Western blot (WB)

Los geles de poliacrilamida fueron transferidos a membranas de PVDF Immobilon® P – Millipore (previamente hidratadas en metanol) con amortiguador de Transferencia (25 mM Tris – HCl, 192 mM Glicina, 20% Metanol), 1 hora a 350 mA constante, 100V, a 4° C. Se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS. Se incubó con las diluciones correspondientes de anticuerpos primarios (anti- EF1 α 1:25,000; anti-H3 1:8,000; anti-TIM 1:2,000; anti-PGK 1:100; anti-GAPDH 1:200) en una solución de leche descremada al 2% en PBS con Tritón X-100 al 0.05%. Luego de los lavados, se incubó con los anticuerpos secundarios correspondientes (acoplados a peroxidasa) por 1 hora (1:50,000). Para la reacción de quimioluminiscencia se utilizó SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate – **Thermo Scientific** (cat# 34080), según especificaciones del fabricante. Las señales se registraron en placas Carestream® Kodak® BioMax® XAR Film – **Sigma Aldrich** (cat# F5763EA).

10. Inmunofluorescencia

Los epimastigotes de *T. cruzi* o los fragmentos celulares, se fijaron en láminas portaobjeto con paraformaldehido 4% en PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 0.5%, simultáneamente, por 10 minutos a temperatura ambiente. Se bloqueó con albúmina sérica bovina (BSA) 2% en PBS por 2 horas. Se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en BSA 1% - PBS por una hora (anti-Actina1 1:400, anti-EF1 α 1:800, anti-Tubulina 1:800). Se realizaron 6 lavados y luego se incubaron con los anticuerpos secundarios: Alexa 488 (verde) y Alexa 555 (rojo) diluidos a 1:400 en BSA 1% - PBS, por una hora en oscuridad. Para la tinción de núcleos se agregó TOTO-3 a una concentración de 2 μ M (para microscopía confocal) o DAPI 1:1,000 de un stock de 5 mg/ μ L (para epifluorescencia), junto con la dilución de anticuerpos secundarios. Las muestras fueron vistas con *microscopio confocal LSM 5 Pascal– Zeiss* con láser de argón/criptón y de helio/neón y filtros BP 450-490 y BP 546/12, o con microscopio de epifluorescencia Olympus BX51.

IX. RESULTADOS

1. Selección de marcadores para fracciones citoplasmáticas y nucleares de epimastigotes de *T. cruzi*.

El uso de marcadores en procedimientos de fraccionamiento celular es imprescindible para comprobar la pureza de los extractos obtenidos. Los anticuerpos comerciales desarrollados en metazoarios y utilizados como marcadores tienen muy poca reactividad cruzada con epítopes de tripanosomátidos, probablemente debido a su divergencia temprana, esto reduce considerablemente el número de marcadores útiles para nuestro modelo.

El anticuerpo monoclonal comercial anti-EF1 α fue desarrollado contra un extracto purificado de proteínas citoplasmáticas de *T. brucei* (Kaur et al., 1994), especie estrechamente emparentada con *T. cruzi*., por lo que se probó como posible marcador citoplasmático. Este anticuerpo monoclonal reconoce fuertemente dos bandas en lisados completos de epimastigotes, una banda del peso esperado para EF1 α (~50kDa) y frecuentemente otra de menor peso (~35 kDa) (ver **Figura 1**, Panel B-carril 1), que podría corresponder a una forma truncada (TcCLB.510119.9), que también ha sido descrita en *Leishmania infantum* (Kamoun-Essghaier et al., 2005), organismo estrechamente emparentado.

Otros marcadores citoplasmáticos evaluados fueron: TIM es una enzima glicolítica, constitutiva y de localización citoplasmática. El antisuero policlonal anti-TIM de *G. lamblia* (protozoario flagelado del grupo de excavata, junto a *T. cruzi*) reconoció dos bandas (~50 kDa y ~60 kDa), ninguna en el peso esperado para dicha proteína (27 kDa), búsquedas bioinformáticas no mostraron secuencias similares que expliquen este reconocimiento cruzado. Se descartó el anticuerpo anti-TIM de *G. lamblia* como posible marcador citoplasmático (ver **Figura 1**, Panel B-carril 3). Los anticuerpos comerciales anti-Fosfogliceratokinasa (PGK) (ver **Figura 1**, Panel B-carril 4), desarrollado contra *T. brucei*, y anti-GAPDH de *H. sapiens* (ver **Figura 1**, Panel B-carril 5), utilizado ampliamente como marcador de carga, reconocieron bandas inespecíficas en los ensayos de WB, por lo que no fueron seleccionados como marcadores citoplasmáticos. Con estos resultados, el único marcador citoplasmático disponible para este proyecto fue el anticuerpo anti-EF1 α .

Los anticuerpos contra histonas son utilizados ampliamente como marcadores nucleares (Chen et al., 2000; Golubovskaya et al., 2005; Tsuji et al., 2014) y es una proteína fuertemente conservada entre especies evolutivamente distantes (Krebs et al., 2014). El anticuerpo comercial anti-H3 fue desarrollado contra el extremo C-terminal de la isovariante histona H3.3 de *H. sapiens* y su reactividad cruzada ya fue reportada en lisados completos de *T. cruzi* (Respuela et al., 2008). En ensayos de

WB observamos fuerte reconocimiento de una banda en el peso esperado (~15kDa) e inconstantemente otras dos con menor intensidad (~31 y 66 kDa) (ver **Figura 1**, Panel B-carril 2). Búsquedas bioinformáticas, en el genoma de *T. cruzi*, no mostraron proteínas similares a Histona H3 que explique el reconocimiento cruzado con estas bandas.

Para caracterizar las fracciones celulares vistas por microscopía durante el fraccionamiento celular, se evaluó la utilidad de los marcadores previamente seleccionados, anti-EF1 α y anti-Histone H3, en ensayos de inmunolocalización. En preparaciones de parásitos completos, la señal del marcador citoplasmático anti-EF1 α fue adecuada, observamos una distribución difusa de la señal de EF1 α a lo largo del cuerpo y flagelo del parásito (ver **Figura 2**). Por el contrario el marcador nuclear anti-Histona H3 mostró señal inespecífica a lo largo del cuerpo celular y el flagelo por lo que no se utilizó posteriormente para estudios de inmunolocalización (ver **Figura 2** y Apéndice 3).

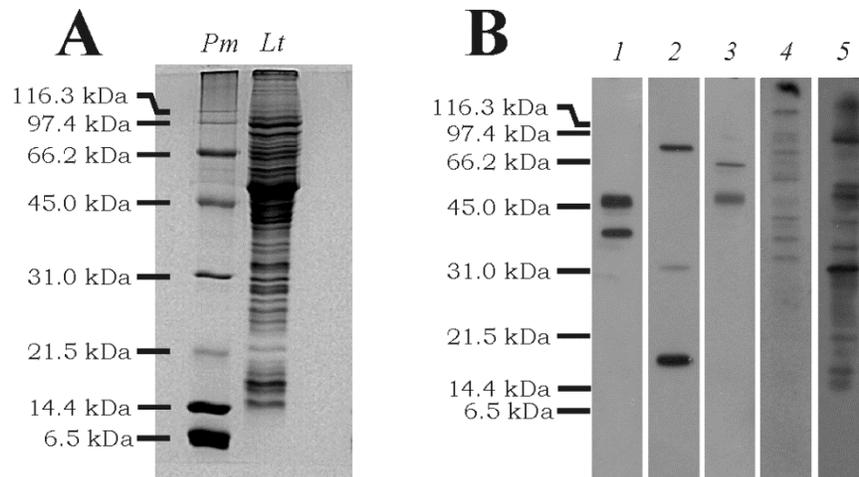
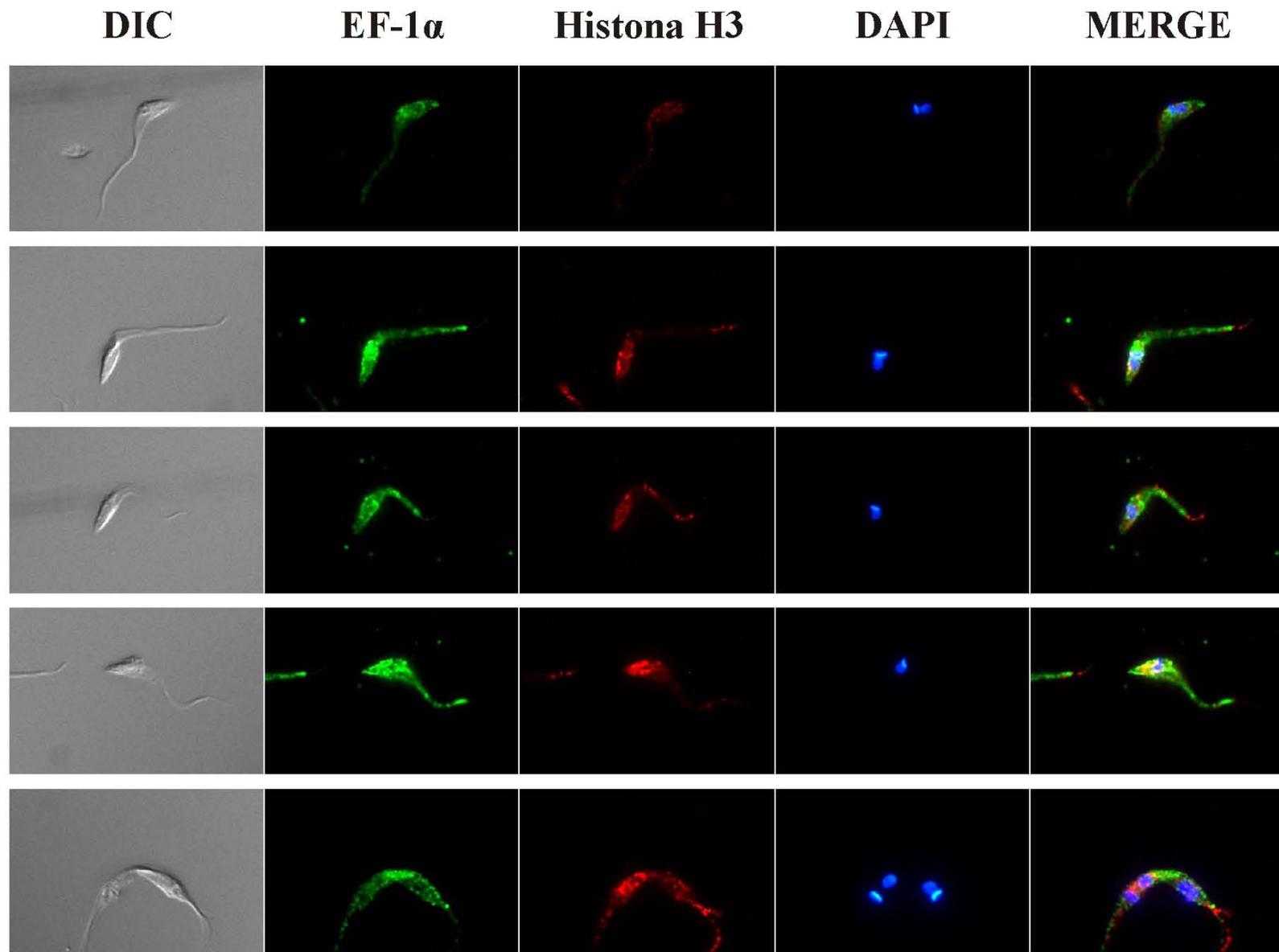


FIGURA 1 Análisis de los marcadores citoplasmáticos y nucleares en lisados completos de epimastigotes

Panel A: gel de poliacrilamida 12% de lisado total (Lt) de epimastigotes de *T. cruzi*, a la izquierda marcadores de peso molecular (Pm). Panel B: WB de lisados completos de epimastigotes, carril 1: anti- EF1 α ; carril 2: anti-H3; carril 3: anti-TIM; carril 4: anti-PGK; carril 5: anti-GAPDH.

FIGURA 2: Epifluorescencia de epimastigotes completos con anti-EF1 α y con anti-Histona 3.

Microfotografías de epifluorescencia 100X de epimastigotes de *T. cruzi* en fase media logarítmica vistas en campo claro con contraste de interferencia diferencial (DIC), inmuno-marcados con anticuerpo primario anti-EF1 α (verde), anti-Histona H3 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI (azul); la última columna muestra la composición (MERGE) de las imágenes. Se muestra microfotografías representativas de distintos campos en dos experimentos independientes.



2. Caracterización de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de epimastigotes de *T. cruzi* con NE-PER™

Para obtener fracciones enriquecidas de proteínas citoplasmáticas y nucleares se utilizaron técnicas de fraccionamiento celular, que son ideales para enriquecer y analizar organelos intracelulares y complejos proteínicos (Huber et al., 2003). La presencia del corset sub-pelicular de microtúbulos complica los procedimientos de fraccionamiento celular en tripanosomátidos (De Souza & Da Cunha-e-Silva, 2003), razón por la cual muchos productos comerciales para fraccionamiento son poco eficientes. NE-PER™ ha sido uno de los pocos reportados con resultados adecuados en el fraccionamiento citoplasmático y nuclear de *Leishmania donovani*, miembro del grupo de tripanosomátidos junto con *T. cruzi* (Kumar et al., 2009), por lo que se evaluó su utilidad en este proyecto.

En el fraccionamiento con NE-PER™ se obtienen tres fracciones: una fracción citoplasmática, una fracción nuclear y un precipitado final de restos celulares y DNA genómico al que denominaremos “pellet final”. Para los ensayos de WB se cargó cantidades equivalentes de proteínas de cada muestra (lisado total, fracción citoplasmática, fracción nuclear).

El comportamiento de los marcadores citoplasmático y nuclear no fue el esperado en las fracciones obtenidas por este método. En los ensayos de WB, el marcador citoplasmático EF1 α se enriqueció en la fracción citoplasmática pero observamos un importante reconocimiento de este marcador en la fracción nuclear (ver **Figura 3**, Panel A), lo que sugería una importante contaminación citoplasmática de la fracción nuclear. El marcador nuclear anti-Histona H3, que debía estar enriquecido exclusivamente en la fracción nuclear, fue reconocido principalmente en el pellet final (ver **Figura 3**, Panel B).

Actina fue reconocida en las tres fracciones. Observamos enriquecimiento de actina en la fracción citoplasmática, mientras que en la fracción nuclear fue escasa. Curiosamente observamos una significativa señal de actina en el pellet final, que fue incluso mayor a la observada en la fracción nuclear (ver **Figura 3**, Panel C).

Las fracciones corridas en geles de poliacrilamida y teñidos con azul de Coomassie muestran la integridad proteínica de las muestras (ver **Figura 3**, Panel D). En el lisado total predomina una banda de 50 kDa, que corresponde a tubulina. Tubulina es la proteína más abundante en este parásito y es el principal componente del corset sub-pelicular. En la fracción citoplasmática hubo enriquecimiento de proteínas de bajo peso molecular (< 40 kDa), mientras que en la fracción nuclear se observó enriquecimiento de proteínas de alto peso molecular (> 40 kDa). En el pellet final observamos principalmente

5 bandas: una de 50 kDa aproximadamente, que correspondería a tubulina, una banda de 31 kDa aprox. de naturaleza no definida, y tres bandas que migran en el rango de 14 a 18 kDa y que corresponden a las tres bandas de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) (Marques Porto et al., 2002), lo que correlaciona bien con el enriquecimiento del marcador nuclear anti-Histona H3 en el pellet final visto en los ensayos de WB, que se mencionó previamente.

El seguimiento microscópico durante el fraccionamiento celular, es una técnica recomendada para corroborar la correcta obtención de las fracciones celulares (De Souza & Da Cunha-e-Silva, 2003). El seguimiento microscópico del fraccionamiento en nuestro modelo biológico fue complicado por su reducido tamaño (diámetro de trypanosomátido 2 μm , diámetro de su núcleo 1.5 μm ; células HELA diámetro del núcleo 10 μm , largo de la mitocondria 1-2 μm) (De Souza & Da Cunha-e-Silva, 2003; De Souza, 1984; Rocha et al., 2008; Rout et al., 2001). Fue necesario emplear aumentos ópticos de gran magnitud 100X (límite de resolución 0.2 μm) y contraste de interferencia diferencial (DIC) (Olympus, manual del usuario) que nos permitieron observar estructuras finas como el flagelo.

La fracción citoplasmática se obtiene con los reactivos CER-I y CER-II de NE-PER™. Con el reactivo CER-I observamos aumento del volumen celular del parásito (ver **Figura 4**, Panel superior derecho), sin compromiso de la integridad de la membrana celular (corroborada por la exclusión del colorante supravital Erytrosin B). Idealmente el reactivo CER-II solo debe romper la membrana citoplasmática y dejar íntegra la envoltura nuclear, pero al agregar CER-II se produjo lisis completa del parásito quedando únicamente flagelos libres en el medio (ver **Figura 4**, Panel inferior izquierdo). Los flagelos permanecieron aparentemente íntegros hasta el final del proceso (ver **Figura 4**, Panel inferior derecho y **Figura 5**). La tinción con DAPI demuestra que el DNA quedó libre, suspendido en el medio (ver **Figura 5**). En campo claro, no observamos formas redondeadas, de tamaño homogéneo y bordes regulares que sugiriese la presencia de núcleos (ver **Figura 5**). Los resultados evidenciaron que el fraccionamiento con este método es inadecuado para obtener fracciones citoplasmáticas y nucleares de nuestro modelo biológico.

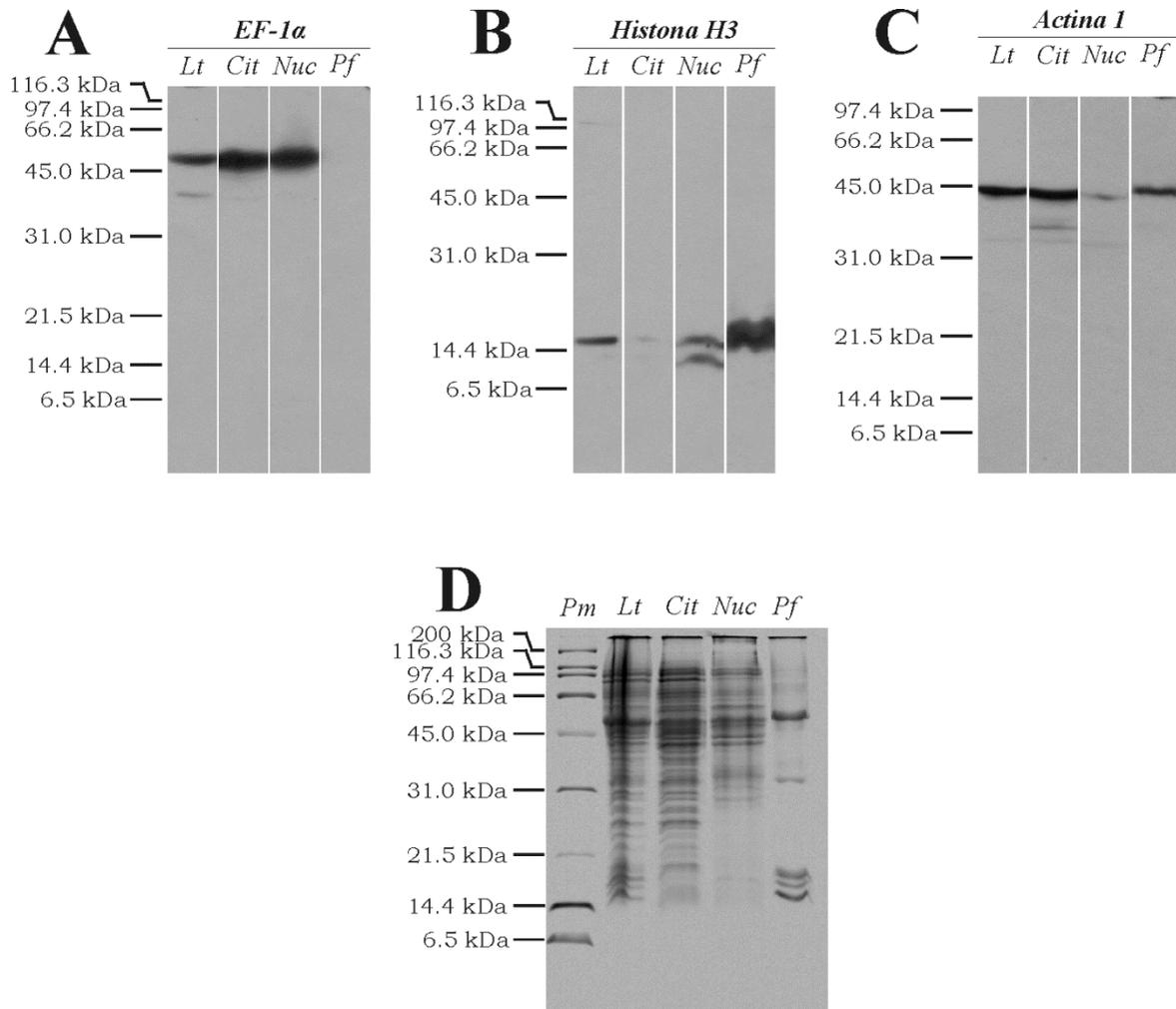
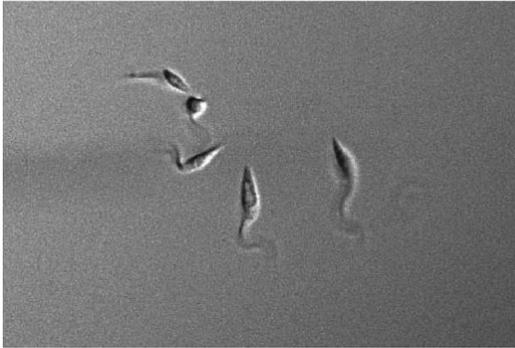


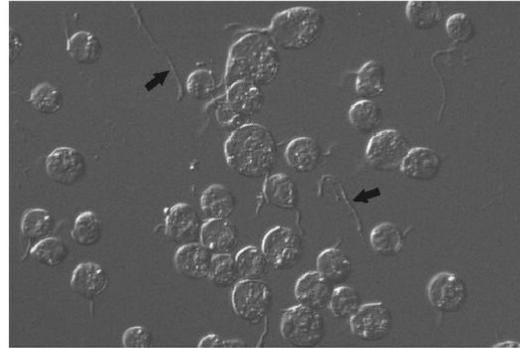
FIGURA 3: Comportamiento de los marcadores citoplasmáticos y nucleares en el fraccionamiento celular con NE-PER

WB de lisado total (Lt), fracción citoplasmática (Cit), fracción nuclear (Nuc) y pellet final (Pf) obtenidos durante el fraccionamiento celular de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con NE-PER. Incubados con anticuerpo monoclonal anti-*EF1α* (**Panel A**), suero policlonal anti-Histone H3 (**Panel B**) y suero policlonal anti-Actina1 de *T. cruzi* (**Panel C**). Gel de poliacrilamida (4/12%) como control de las muestras corridas en los ensayos de WB (**Panel D**). Se cargaron cantidades equivalentes de proteínas en todos los carriles: 20 µg de proteína.

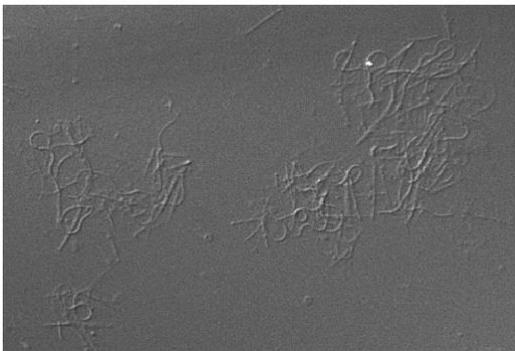
Epimastigotes



CER-I



CER-I y CER-II



NER

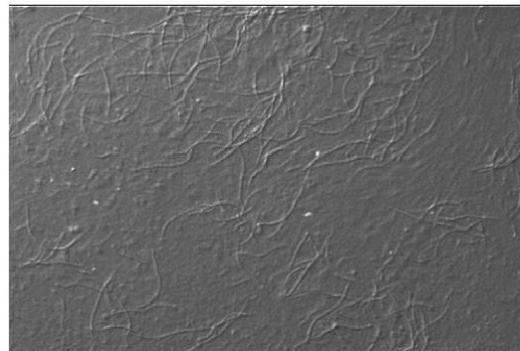


FIGURA 4: Fraccionamiento de epimastigotes de *T. cruzi* con kit comercial NE-PER

Microfotografías 40X en DIC de epimastigotes de *T. cruzi* resuspendidos en: PBS (panel superior izquierdo), CER-I (Panel superior derecho), CER-I y CER-II (panel inferior izquierdo) y NER (Panel inferior derecho). Las flechas negras resaltan la presencia de flagelos libres cuando los epimastigotes se resuspendieron en CER-I, indicativo de lisis de epimastigotes.

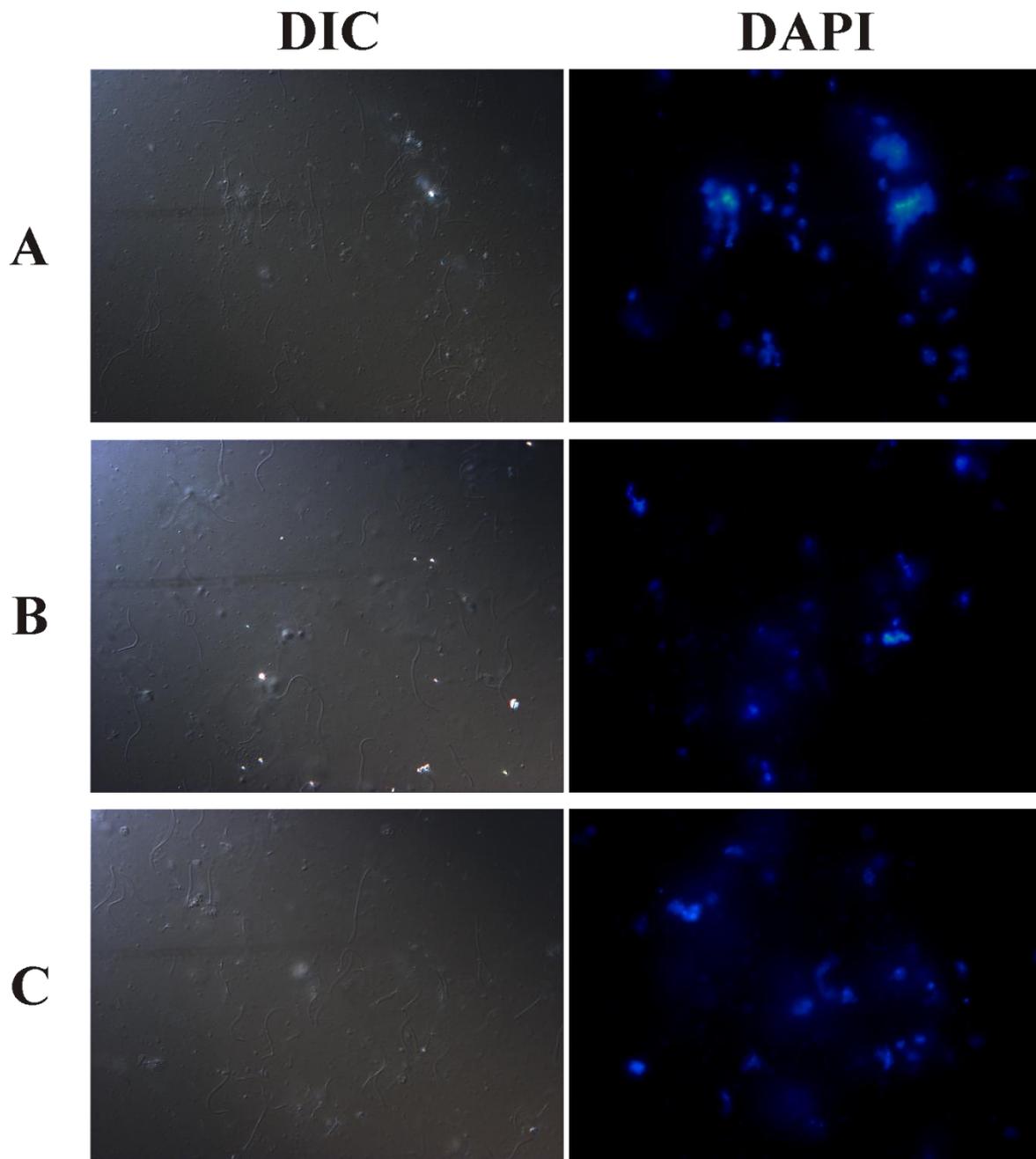


FIGURA 5: Lisis completa de parásitos con reactivo CER-II

Paneles A, B y C: microfotografías 100X representativas de experimentos independientes en DIC (columna izquierda) y control con DAPI (columna derecha) tomadas luego que los parásitos se lisaron en CER-II y se resuspendieron en NER.

3. Caracterización de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de epimastigotes de *T. cruzi* con Nonidet P-40 0.5%

Debido a que el fraccionamiento con NE-PER™ fue inadecuado, se optó por obtener núcleos por un método que ha sido ampliamente aplicado en *L. major* (Martínez-Calvillo et al., 2004; S Martínez-Calvillo et al., 2001; Martínez-Calvillo et al., 2003), organismo estrechamente emparentado con *T. cruzi* y con el que comparte la misma estructura celular (Gull, 1999). Este método permite obtener extractos enriquecidos de núcleos por lisis de la membrana citoplasmática en Nonidet P-40 al 0.5%. Nonidet P-40 es un surfactante no iónico que se caracteriza por la lisis selectiva de la membrana citoplasmática sin alterar la envoltura nuclear. Este método ha sido empleado con éxito en nuestro laboratorio para ensayos de “Run-On” en *T. cruzi* (Hernández et al., 2012; Nepomuceno-Mejía et al., 2010).

El marcador citoplasmático EF1 α se enriqueció en la fracción citoplasmática pero también se observó señal en la fracción nuclear (ver **Figura 6**, Panel A). Por otro lado el marcador nuclear, Histona H3 se vio claramente enriquecido en la fracción nuclear y completamente ausente en la fracción citoplasmática (ver **Figura 6**, Panel B). Actina se enriqueció en la fracción citoplasmática en comparación con la fracción nuclear (ver **Figura 6**, Panel C). El control de la integridad proteínica de las muestras, visto en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie, mostró una banda de 50 kDa predominante en el lisado total y en la fracción nuclear, que corresponde a tubulina (ver **Figura 6**, Panel D). Además, en la fracción nuclear observamos enriquecimiento de las 3 bandas correspondientes a histonas en el rango de pesos de 14 a 18 kDa (Marques Porto et al., 2002).

El seguimiento microscópico con DIC del proceso de fraccionamiento mostró que la mayor parte de los núcleos obtenidos por este método queda relacionado a su flagelo y kinetoplasto. Los epimastigotes (ver **Figura 7**, Panel A) al ser resuspendidos en amortiguador hiposmolar se tornan redondeados (ver **Figura 7**, Panel B), con flagelos móviles y sin pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática (exclusión del colorante supravital Erythrosin B). Luego de agregar el Nonidet P-40 a una concentración final de 0.5% (ver **Figura 7**, Panel C) observamos lisis de la membrana citoplasmática, quedando restos celulares de sustancias amorfas (ver **Figura 7**, Panel C: puntas de flecha negra) que contiene una estructura central redondeada, que corresponde al núcleo (ver **Figura 7**, Panel C: control con DAPI). Los núcleos (ver **Figura 7**, Panel D: flecha negra) quedan asociados a en más del 90% a su flagelo (ver **Figura 7**, Panel D: flecha blanca) y al Kinetoplasto (DNA mitocondrial sumamente condensado, que se observa como una señal lineal intensa de DAPI

contigua a la señal redondeada y más débil del núcleo). Pese a los golpes con Dounce no se logró liberar los flagelos y kinetoplastos de los núcleos. Los intentos para purificar los escasos núcleos libres de flagelos y kinetoplastos por gradientes de densidad de sacarosa al 0.8 M (ver **Figura 9** y Apéndice 4) o sacarosa 0.75 M – Percoll 35% (ver **Figura 8** y Apéndice 4) no mejoraron los resultados.

Por ensayos de epifluorescencia de la fracción nuclear, observamos la presencia de EF1 α a lo largo del flagelo y en el detritus que rodea el núcleo de (ver **Figura 10**), lo que correlaciona con la señal de EF1 α vista en los ensayos de WB de la fracción nuclear. Estos resultados muestran que la fracción nuclear obtenida por este método es un enriquecido de proteínas nucleares, flagelares y del kinetoplasto.

Para determinar si la señal de actina, tiene una localización nuclear, flagelar o en el kinetoplasto, ubicaciones de actina reportadas en *Leishmania donovani* estrechamente relacionado con *T. cruzi* (Sahasrabudde et al., 2004), se hicieron ensayos de inmunolocalización. En las imágenes de epifluorescencia (Apéndice 5) y microscopia confocal (ver **Figura 11**) observamos señal intensa de actina entre la base del flagelo y el kinetoplasto, también se observó señal de actina paralela al flagelo, y una señal difusa rodeando al núcleo (que corresponde a la sustancia amorfa, antes descrita); no observamos señal de actina al interior del núcleo (ver **Figura 11** y Apéndice 5).

Aprovechando una exhibición del microscopio de superresolución Carl Zeiss LSM880 con sistema AIRYSCAN hicimos un análisis preliminar de la distribución de actina y tubulina tanto en epimastigotes completos como en nuestra fracción núcleo-kinetoplasto-flagelar. En las imágenes obtenidas identificamos una concentración considerable de actina al interior del kinetoplasto, en preparaciones de parásitos completos (ver **Figura 12**) que se pierde en la preparación de núcleos (ver **Figura 13**). Por otro lado, observamos un agregado independiente de actina en la región comprendida entre el kinetoplasto y la base del flagelo que no parece pertenecer al bolsillo flagelar, tanto en preparaciones de parásito completo como en las preparaciones de núcleo, (ver **Figura 12** y **Figura 13**). Las imágenes de superresolución muestran claramente que la acumulación de actina está por debajo del cuerpo basal (nacimiento del flagelo) mientras que el fondo del bolsillo flagelar está por encima del cuerpo basal, en la zona de transición del flagelo (Field et al., 2009; Langousis et al., 2014) (ver **Figura 12**). En las imágenes de superresolución tomadas de las muestras núcleo-kinetoplasto-flagelares, obtenidas por fraccionamiento de epimastigotes en Nonidet P-40 y permeabilizadas en Triton X-100 (para los ensayos de inmunofluorescencia) observamos la pérdida de la señal de actina en el kinetoplasto, pero persiste el

cúmulo de actina entre el kinetoplasto y el flagelo, siendo este último resistente al procesamiento con los detergentes antes mencionados (ver **Figura 13**).

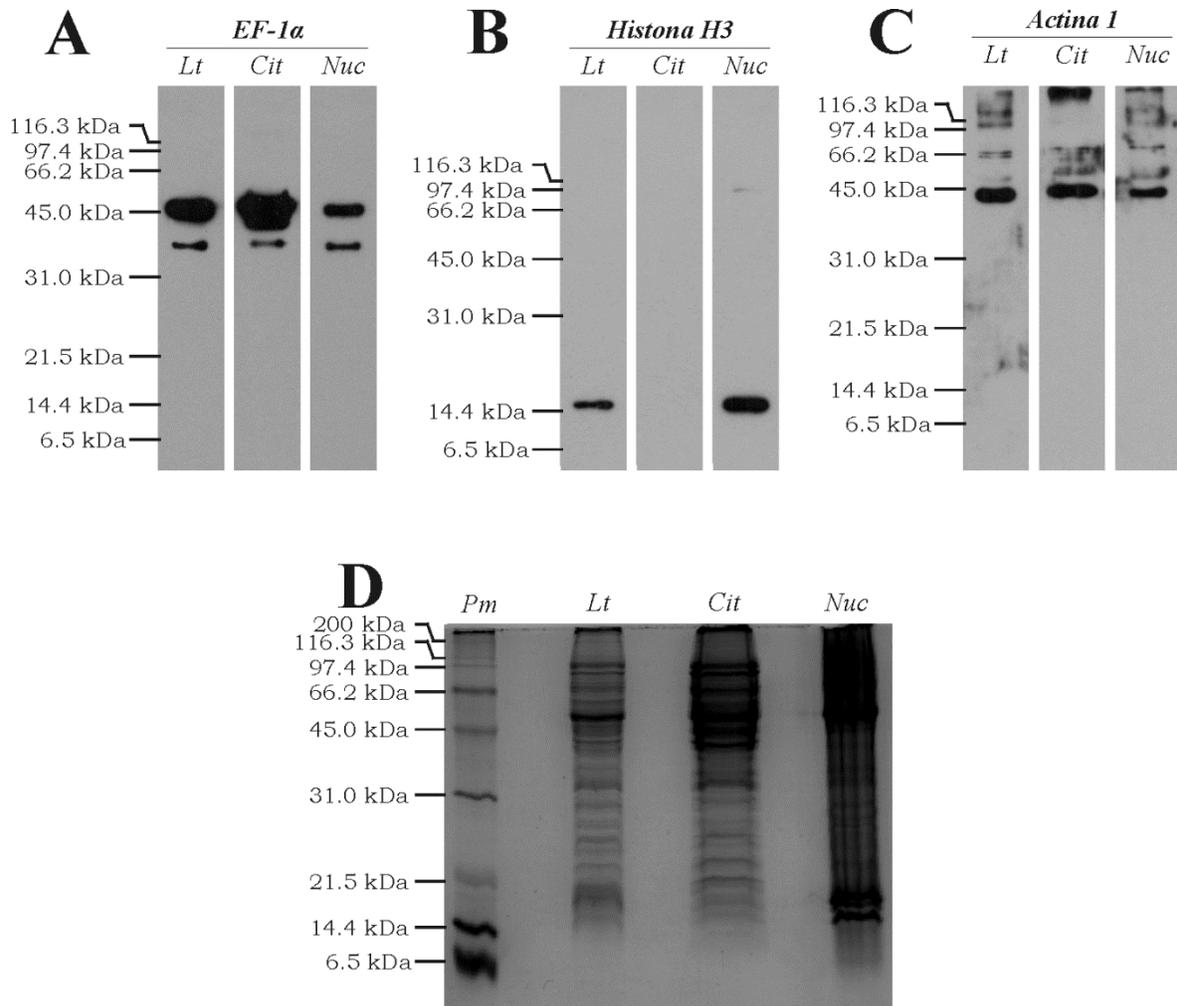


FIGURA 6: Comportamiento de los marcadores citoplasmáticos y nucleares en el fraccionamiento celular con Nonidet P40 0.5%

WB de lisado total (*Lt*), fracción citoplasmática (*Cit*), y fracción nuclear (*Nuc*) obtenidos durante el fraccionamiento celular de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con NP40 0.5%. Incubados con anticuerpo monoclonal anti-*EF1α* (**Panel A**), suero policlonal anti-Histone H3 (**Panel B**), suero policlonal anti-Actina1 de *T. cruzi* (**Panel C**). Gel de poliacrilamida (4/12%) como control de las muestras corridas en los ensayos de *WB* (**Panel D**). Se cargaron cantidades equivalentes de proteínas en todos los carriles: 20 μ g de proteína.

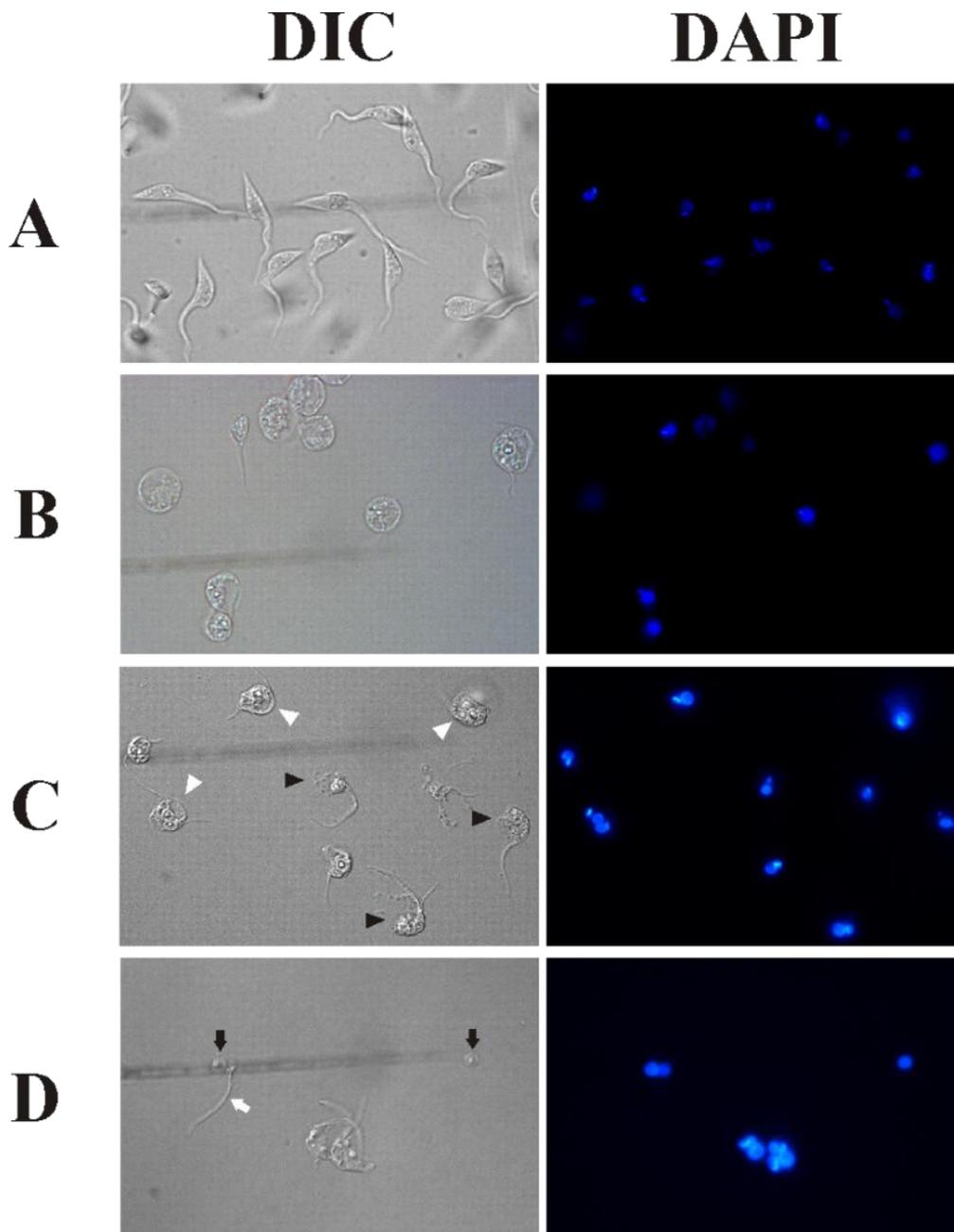


FIGURA 7: Fraccionamiento de epimastigotes de *T. cruzi* con Nonidet P-40 0.5%
 Microfotografías 100X en DIC (columna izquierda) y control con DAPI (columna derecha) de epimastigotes resuspendidos en: PBS (**Panel A**), amortiguador hiposmolar (**Panel B**), Nonidet P-40 al 0.5% (**Panel C**) y luego de los golpes con Dounce (**Panel D**). En el **Panel C**, se observa epimastigotes antes (puntas de flecha blanca) y después (puntas de flecha negras) de la ruptura de la membrana citoplasmática por acción del Nonidet P-40. En el **Panel D**, se señala con flechas negras los núcleos y con la flecha blanca el flagelo.

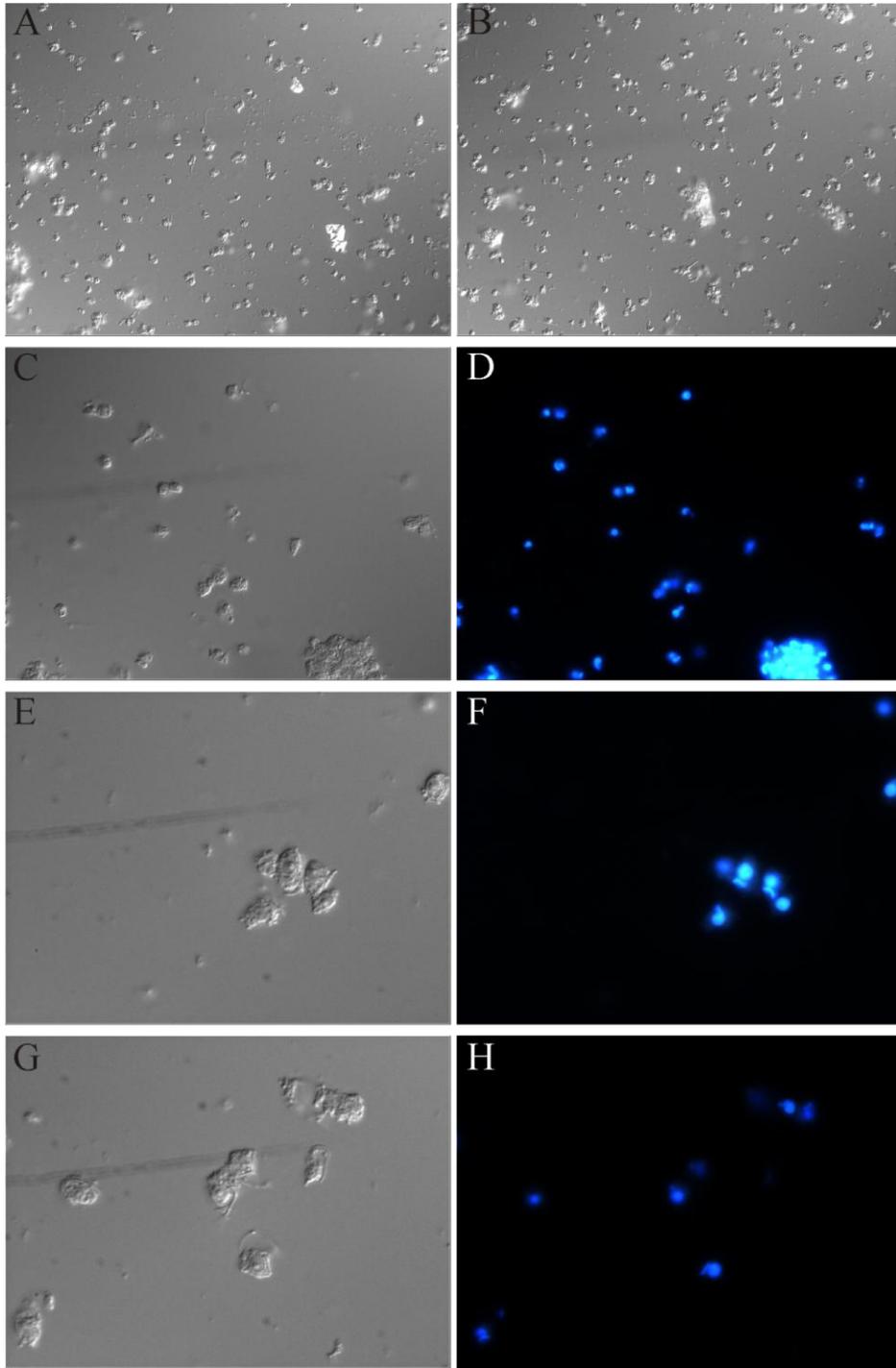


FIGURA 8 Ensayo de purificación de núcleos con Percoll al 35% con sacarosa al 0.75 M. Microfotografías tomadas luego de pasar el extracto nuclear, obtenido por el fraccionamiento de epimastigotes en Nonidet P-40, a través de una columna de Percoll al 35% con sacarosa al 0.75 M. Paneles A y B a 40X en DIC, Panel C a 100X en DIC con su control con DAPI (Panel D), Paneles E y G a 200X con sus controles de DAPI (Panel F y H).

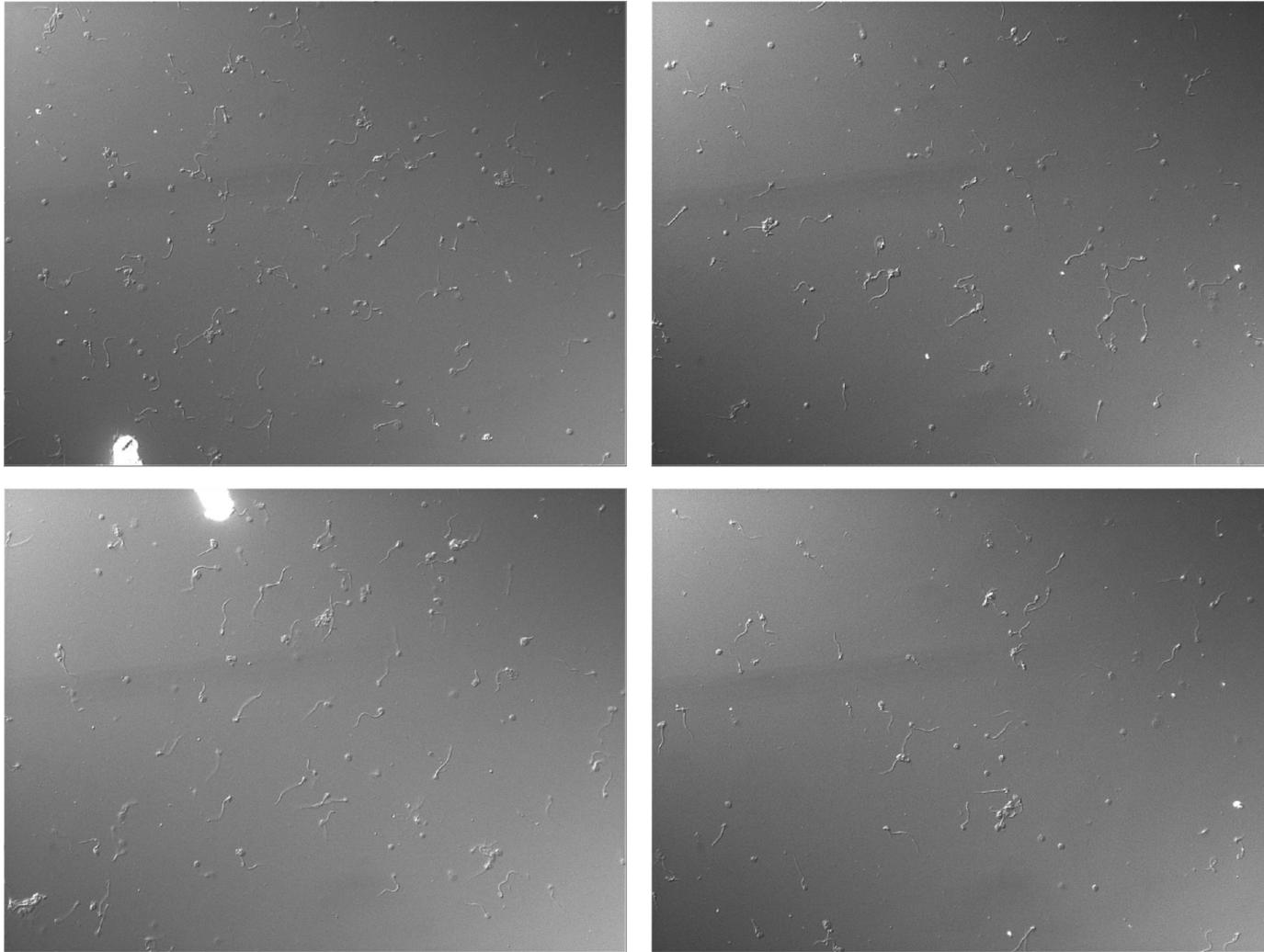


FIGURA 9 Ensayo de purificación de núcleos sacarosa al 0.8 M.

Microfotografías tomadas luego de pasar el extracto nuclear, obtenido por el fraccionamiento de epimastigotes en Nonidet P-40, a través de una columna de sacarosa al 0.8 M. Todos los paneles corresponden a un aumento de 40X. Se muestran campos distintos de dos ensayos independientes.

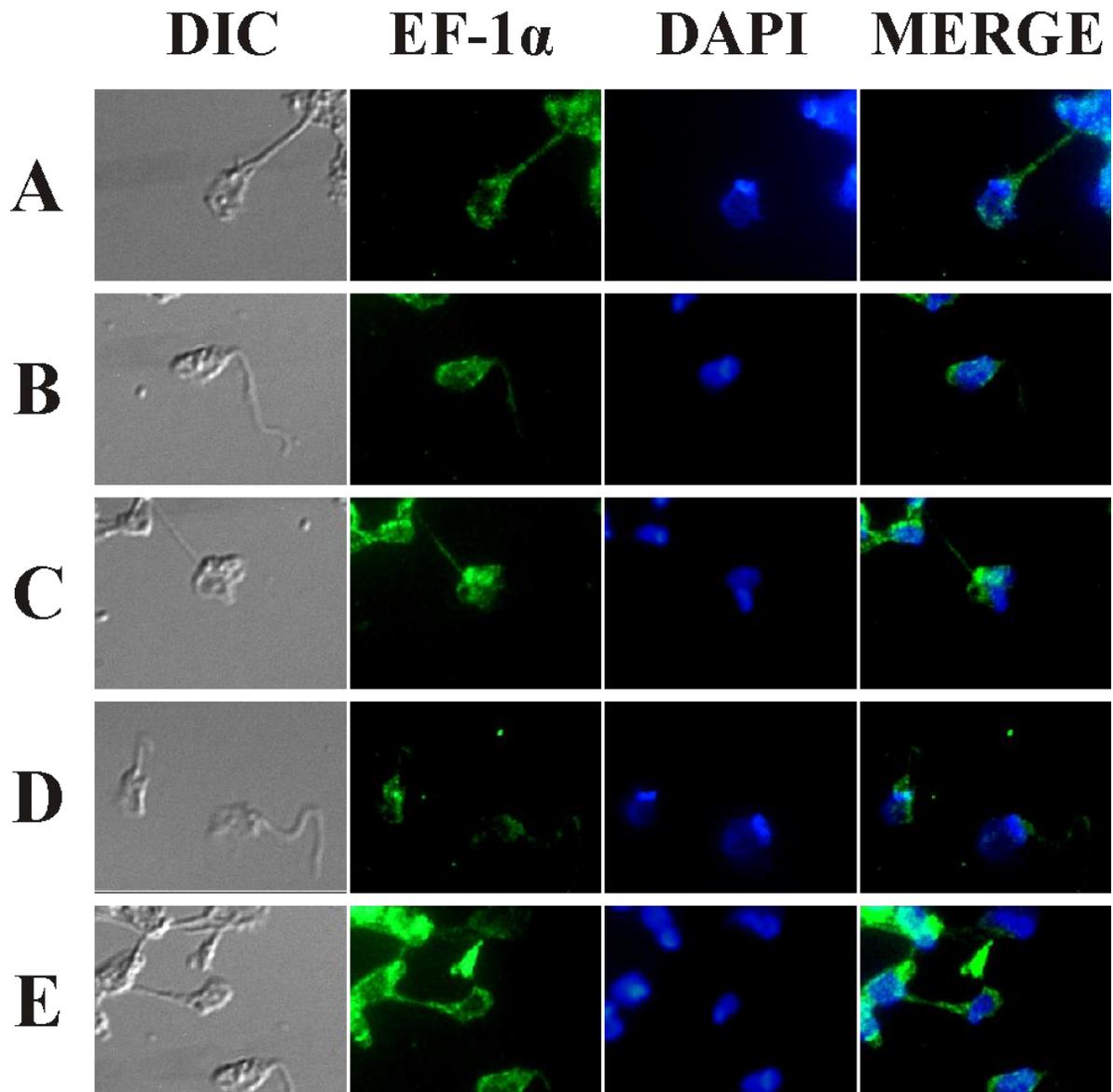


FIGURA 10: Epifluorescencia con anti-EF1 α de la fracción nuclear de epimastigotes obtenidos por el fraccionamiento celular con Nonidet P-40

Microfotografías 100X de epifluorescencia de la fracción nuclear (enriquecido de núcleos, kinetoplasto y flagelos) de epimastigotes de *T. cruzi* obtenidos por el protocolo de fraccionamiento celular con Nonidet P-40 al 0.5% incubados con anti-EF1 α . **Paneles A-E** muestran diferentes campos de un mismo experimento. **DIC**: campo claro con contraste de interferencia diferencial; **EF-1 α** : Señal del anticuerpo primario anti-EF1 α ; **DAPI**: tinción de núcleos con DAPI; **MERGE**: composición de las imágenes de fluorescencia.

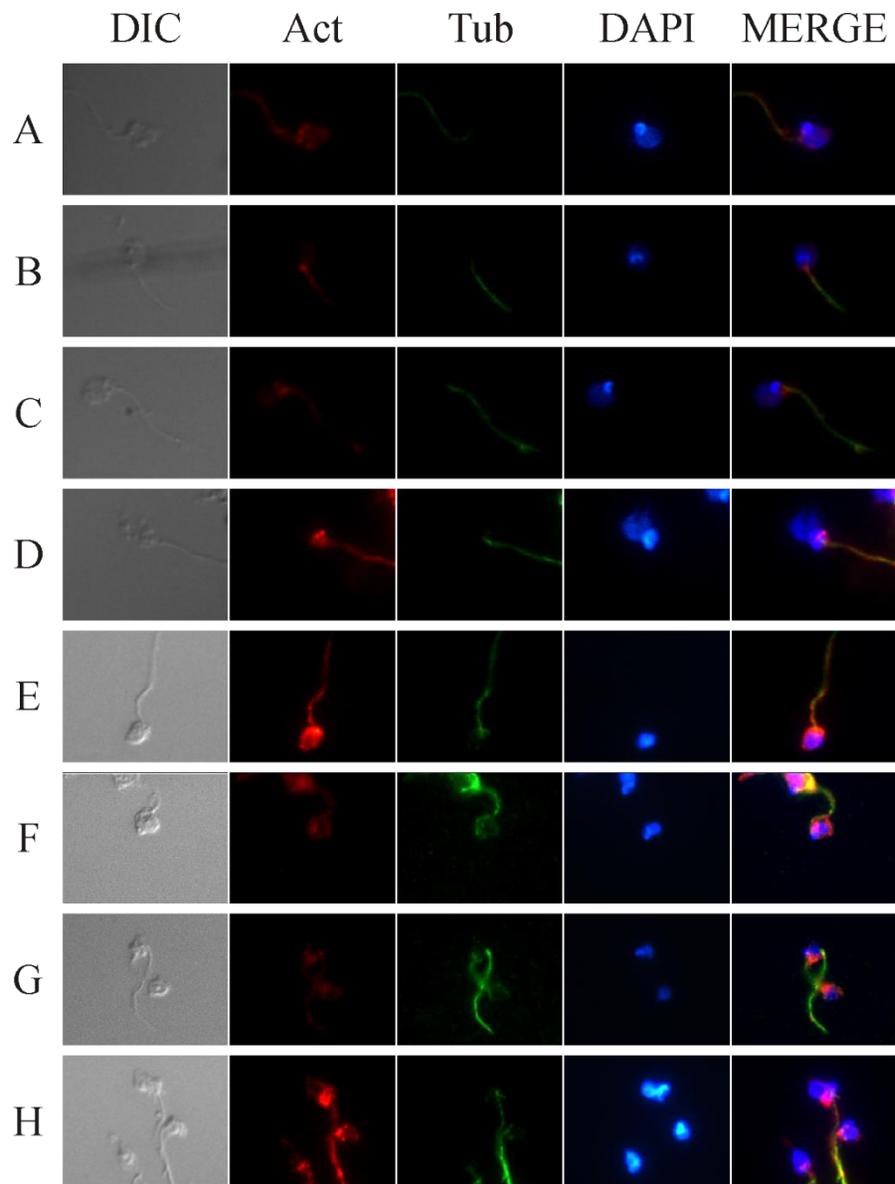


FIGURA 11: Epifluorescencia de fracción nuclear (enriquecido núcleo-kinetoplasto-flagelar)

*Microfotografías de epifluorescencia 100X de la fracción nuclear (enriquecido núcleo-kinetoplasto-flagelar) obtenida por el fraccionamiento celular con Nonidet P-40 de epimastigotes de Trypanosoma cruzi. Microfotografías representativas de dos ensayos independientes. **DIC**: campo claro con contraste de interferencia diferencial; **Act**: anti-Actina 1; **Tub**: anti-tubulina; **DAPI**: tinción de núcleos con DAPI; **MERGE**: composición de las imágenes de inmunofluorescencia (**MERGE**).*

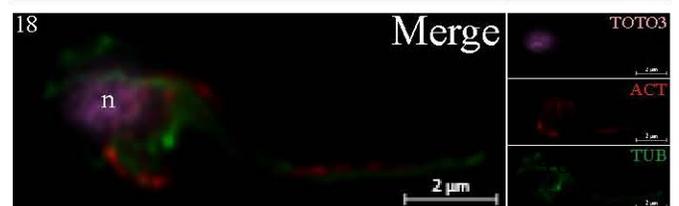
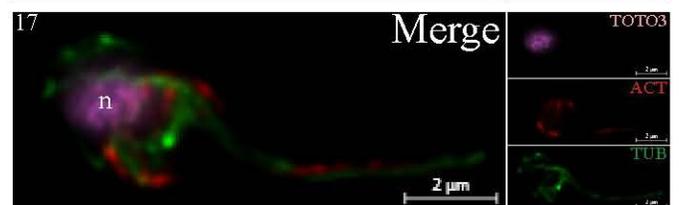
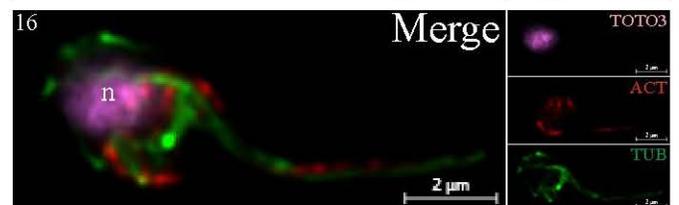
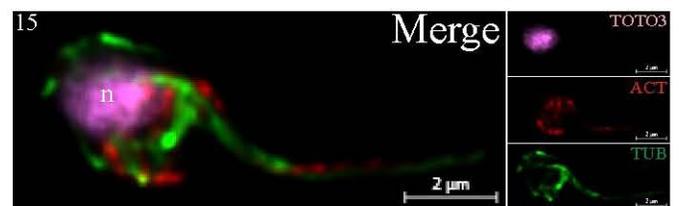
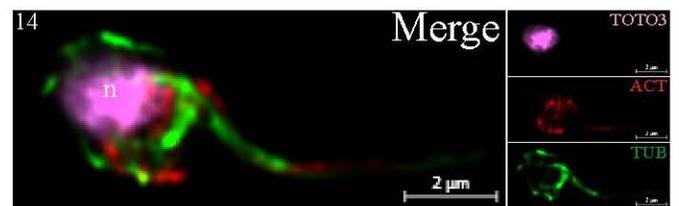
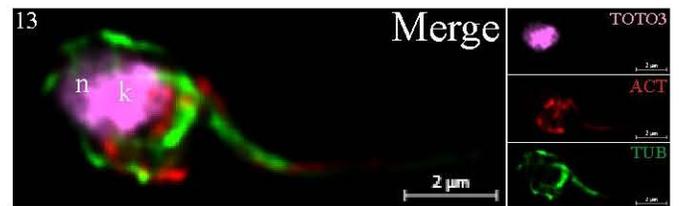
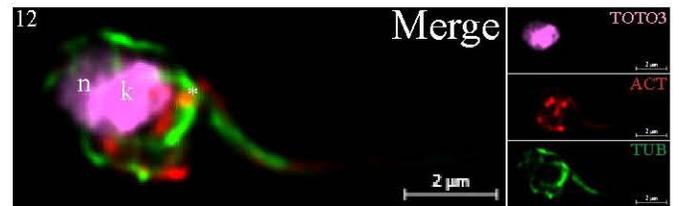
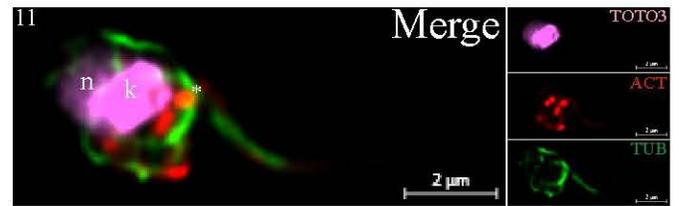
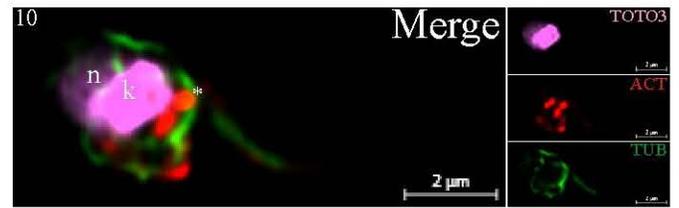
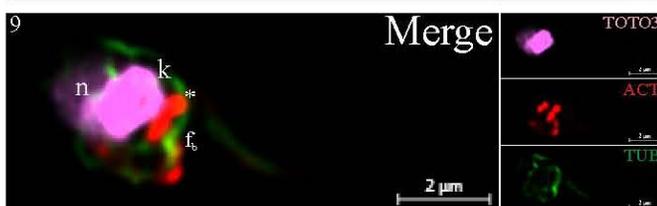
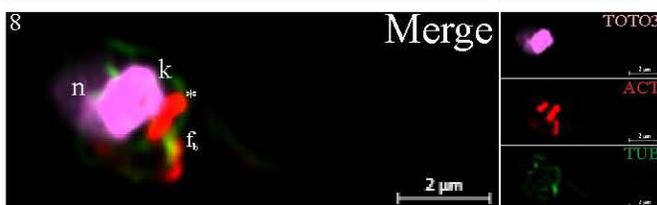
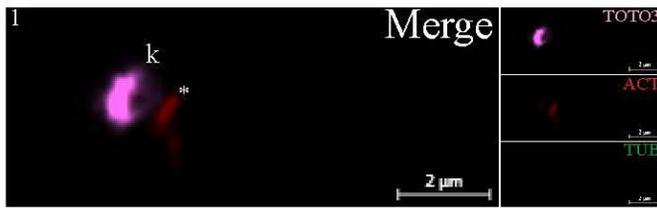


FIGURA 12 Microscopia confocal de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Serie de microfotografías z-stack 100X confocales de superresolución (microscopio Carl Zeiss LSM880 con sistema AIRYSCAN) de preparaciones de parásitos completos de un epimastigote de T. cruzi. Las imágenes corresponden a planos confocales (z-stack) de un solo parásito. El núcleo (n) y el kinetoplasto (k) está teñido con TOTO3 (pseudo-color magenta); la señal de actina (ACT) es de color rojo, y tubulina (TUB) de color verde. Resalta una importante acumulación de actina entre la región que corresponde a la base del flagelo (fb) y el kinetoplasto (k), que lo resaltamos con un asterisco () en las láminas 1-11. También resalta la presencia de actina dentro del kinetoplasto, láminas 5-12. Observamos la señal de tubulina (TUB) predominantemente periférica, rodeando el cuerpo celular a manera de una jaula. El flagelo formado por tubulina (TUB) está acompañado por una señal paralela espiralada de actina (ACT), láminas 11-18.*

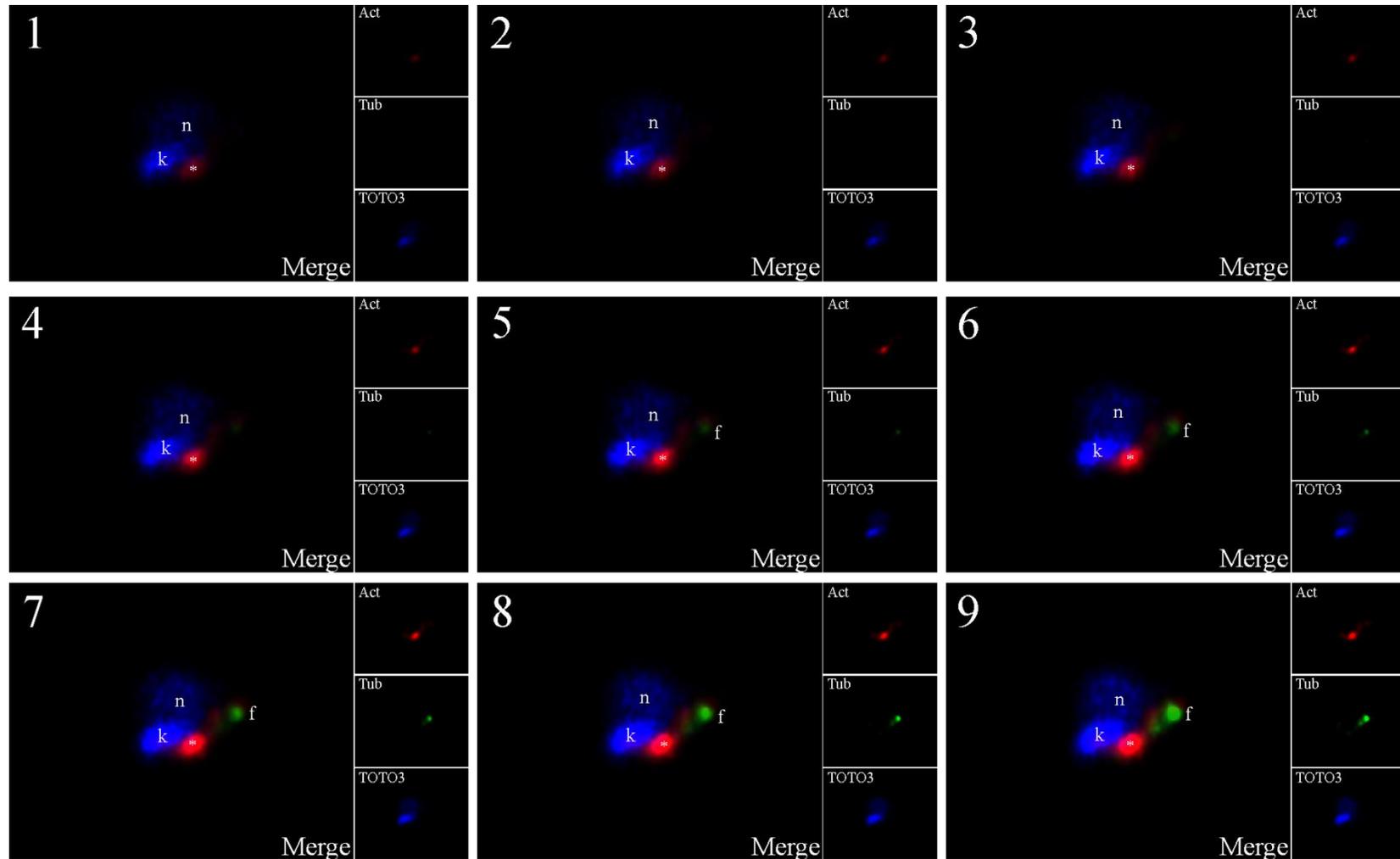


FIGURA 13 Microscopia confocal de fracción nuclear obtenida por fraccionamiento con Nonidet P-40

De **Panel 1 al 9**: Serie de microfotografías 100X de superresolución (microscopio Carl Zeiss LSM880 con sistema AIRYSCAN), de los planos confocales (z-stack) de la fracción nuclear (enriquecidos núcleo-kinetoplasto-flagelares) obtenida con Nonidet P-40 al 0.5%. El núcleo (n) está teñido con TOTO3 (pseudo-color azul), tiene forma ovalada y la señal es tenue que contrasta con la intensa señal lineal del kinetoplasto (k), ubicado por debajo y a la izquierda del núcleo; la señal de actina (*) de color rojo es completamente extranuclear, con un acumulación puntual contigua al kinetoplasto y al núcleo (inferior derecha). Se observa una señal tenue de actina que acompaña paralelamente al flagelo (f) de color verde.

4. Distribución de las especies de actina en las fracciones obtenidas con Nonidet P-40 al 0.5%.

Para demostrar si existe una distribución diferencial de las especies de actina en las fracciones obtenidas se hicieron ensayos de WB de E2D de cantidades equivalentes de proteínas de las fracciones citoplasmática y nuclear, obtenidas por el método de fraccionamiento con Nonidet P-40. La técnica de electroforesis en dos dimensiones (E2D) permite la separación de las proteínas por dos parámetros independientes, el punto isoeléctrico (pI) en la primera dimensión mediante Isoelectroenfoque (IEF) y en la segunda dimensión por la masa molecular en geles de poliacrilamida con SDS (López, 2007).

En las membranas transferidas de los ensayos de E2D y teñidas con azul de Coomassie, observamos que el perfil proteínico es distinto para cada fracción (ver **Figura 14**). Las dos proteínas más abundantes en el lisado total (ver **Figura 14**, Panel A) y en la fracción nuclear (ver **Figura 14**, Panel C) estuvieron en el peso de 50 kDa y tuvieron un pI cercano a 5.0, una de ellas fue reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-tubulina (isoforma α) en ensayos de WB. Estas proteínas no fueron abundantes en la fracción citoplasmática (ver **Figura 14**, Panel B). En la fracción citoplasmática la proteína más abundante pesó alrededor de 100 kDa y tiene un pI entre 5.0 y 5.5 (ver **Figura 14**, Panel B).

En los ensayos de WB de la E2D observamos la presencia de seis especies de actina en lisados de parásitos completos, con pI en el rango de 5.5 y 6.0 (ver **Figura 15**, Panel A, puntos 1-6), especies que también están presentes en la fracción citoplasmática y nuclear, en proporciones similares. En la fracción citoplasmática observamos adicionalmente dos especies de actina más básicas con un pI en el rango de 5.5 a 6.0 (ver **Figura 15**, Panel B, puntos 7 y 8); estas especies poco abundantes no fueron reconocidos nuestros ensayos de E2D de cantidades equivalentes de proteínas de lisados de parásitos completos (ver **Figura 15**, Panel A y B). En la fracción nuclear observamos el enriquecimiento de una especie de actina más básica exclusiva de la esta fracción nuclear, con un pI en el rango de 5.0 a 5.5 (ver **Figura 15**, Panel C, punto 7).

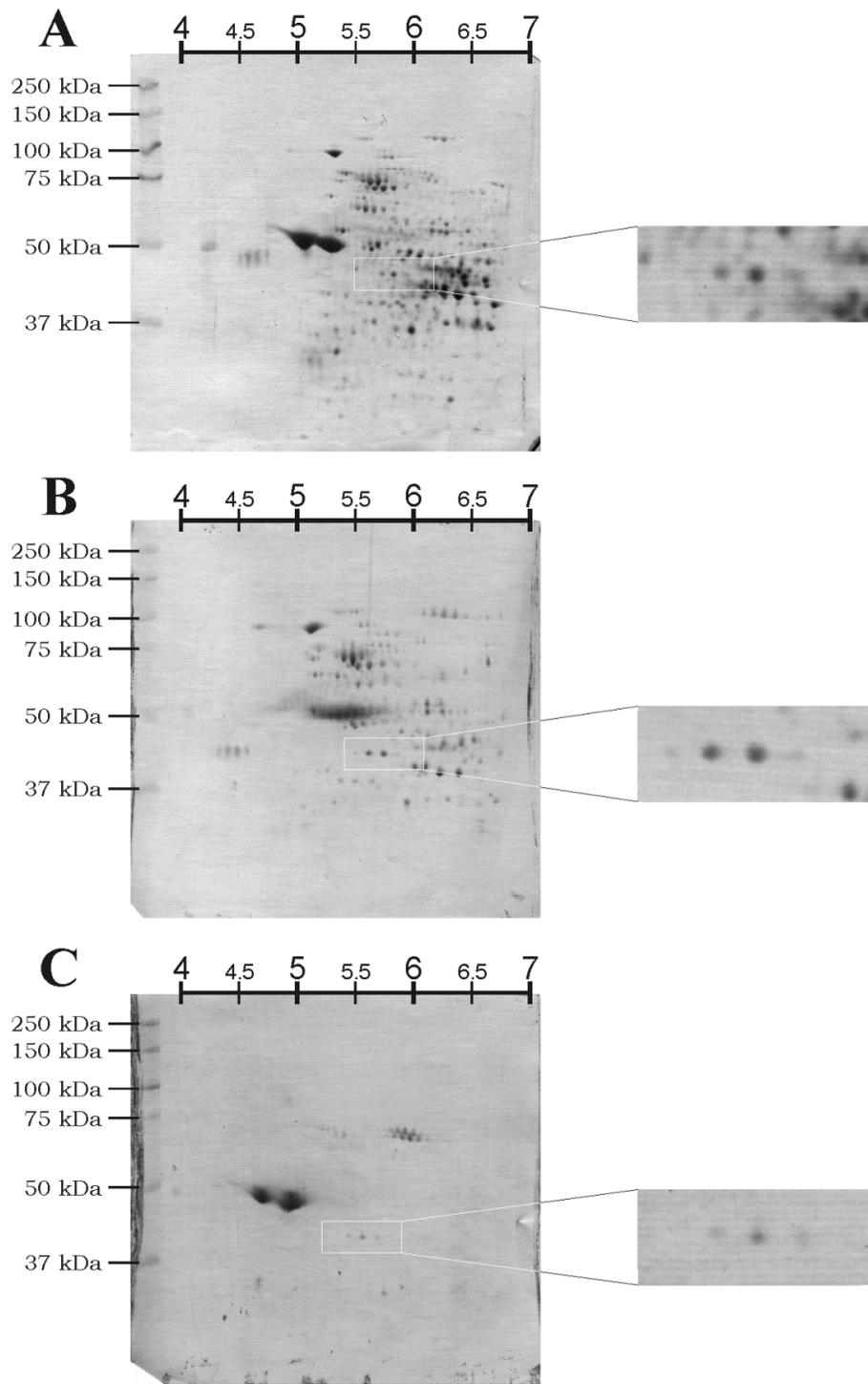


FIGURA 14: Electroforesis de doble dimensión de epimastigotes, fracción citoplasmática y fracción nuclear

Membrana de E2D, teñida con azul de Coomassie. **Panel A:** lisado total, **Panel B:** fracción citoplasmática y **Panel C:** fracción nuclear de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en fase media logarítmica, obtenida por el método de fraccionamiento en Nonidet P-40. A la izquierda estándares de peso molecular, en la parte superior la escala de pH 4-7, los cuadrados de borde blanco corresponde al área donde están los puntos ("spots") de actina identificados por WB (ver **Figura 15**), a la derecha se muestra ampliaciones de dichas áreas. Se cargó el equivalente a 120 µg de proteína para cada fracción.

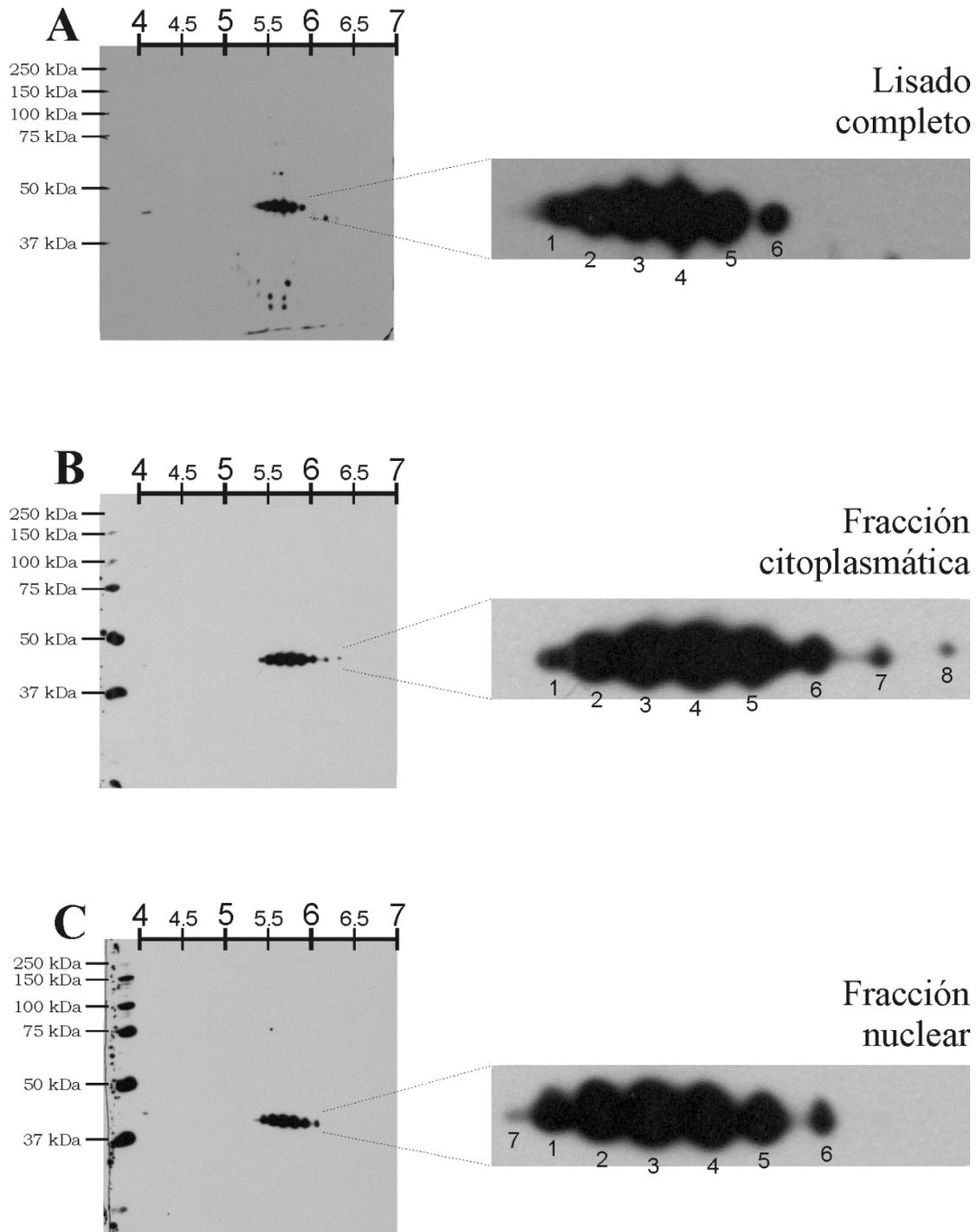


FIGURA 15: Especies de actina reconocidos en lisado total, fracción citoplasmática y fracción nuclear de epimastigotes de *T. cruzi*.

WB de especies de actina reconocidas por suero policlonal anti-Actina1 en fracciones obtenidas con Nonidet P-40 de epimastigotes de *T. cruzi*. **Panel A:** lisado total, **Panel B:** fracción citoplasmática y **Panel C:** fracción nuclear. A la izquierda pesos moleculares; en la parte superior, de cada panel, el rango de pH; a la derecha ampliaciones de las especies de actina reconocidas en cada fracción. Se asignó arbitrariamente del 1 al 6 las formas más abundantes y presentes en todas las fracciones.

X. DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos la presencia de 6 especies de actina 1 presentes tanto en lisados completos de epimastigotes, como en fracciones enriquecidas para proteínas citoplasmáticas y fracciones enriquecidas para proteínas núcleo-kinetoplasto-flagelares; además los resultados sugieren la presencia de especies de actina 1 poco abundantes, que parecen tener una distribución diferencial en epimastigotes de *T. cruzi*. Las 6 especies de actina 1 predominantes tanto en lisados completos, como en las fracciones enriquecidas para fracciones citoplasmática y núcleo-kinetoplasto-flagelares; tienen un *pI* en el rango de 5.5 y 6.0, que correlaciona bien con los hallazgos reportados por Beghini et al (Beghini et al., 2012) y son similares a los vistos en otros metazoarios (Bremer et al., 1981; Carlén et al., 2005; Zechel et al., 1978) (ver **Figura 15**). La diferencia en el *pI* de las especies de actina encontradas en este trabajo y las reportadas por nuestro laboratorio anteriormente (Cevallos et al., 2011) puede deberse a cambios fenotípicos de la expresión de especies de actina que sido reportado en parásito unicelulares mantenidos en medios axénicos, como *T. vaginalis* (Cuervo et al., 2008), que sería interesante investigar. Además, el *pI* de actina también puede variar dependiendo del procesamiento de la muestra corrida en el IEF (Díaz-Camino et al., 1999; Ma et al., 2012).

En cuanto al número de especies identificadas en lisados de parásitos completos, en el trabajo previo de nuestro laboratorio se reportó solo 5 especies de actina (Cevallos et al., 2011); las diferencias con el actual trabajo, donde reportamos 6 especies, se debe a que duplicamos la carga proteínica por gel de doble dimensión (60 µg Vs 120 µg) y usamos el antisuero anti-actina 1 más concentrado, lo que permitió reconocer una forma ácida poco abundante (ver **Figura 15**, Panel A, punto 1). Adicionalmente, en el lisado de parásitos completos, el antisuero anti-actina 1 reconoce proteínas de peso molecular menor a 37 kDa y mayores a 50 kDa, en el rango de *pI* de 5.0 a 6.5, que probablemente sean debidos a reconocimiento cruzado por la naturaleza policlonal de nuestro antisuero. En la fracción citoplasmática identificamos la presencia de dos especies de actinas más básicas, con *pI* entre 6.0 y 6.5 (ver **Figura 15**, Panel B, puntos 7 y 8) en el peso esperado para actina 1, que no han sido reportados hasta el momento en tripanosomátidos. En la literatura revisada no se encontró antecedentes de formas básicas de actina por PTMs que estén enriquecidas en fracciones citoplasmáticas. Por otro lado, en enriquecidos núcleo-kinetoplasto-flagelares se observó el enriquecimiento de una especie de actina 1 más ácida con *pI* menor a 5.5 (ver **Figura 15**, Panel C, punto 7), pero debemos considerar que la mayor parte de actina 1 reconocida en esta fracción está asociada al flagelo (ver **Figura 11** y Apéndice 5). Llama la atención la falta de reconocimiento de las especies de actina 1 observadas en las fracciones (citoplasmáticas y nucleares) y que no fueron observadas en el lisado

completo del parásito, pese a que los ensayos fueron realizados con muestras provenientes del mismo cultivo, procesadas simultáneamente y con los mismos tiempos de exposición. Esto puede ser explicado por la principal fortaleza de los métodos de fraccionamiento. Los métodos de fraccionamiento permiten purificar o enriquecer un compartimento, reduciendo la complejidad proteínica de la muestra; esto aumenta la concentración relativa de sus componentes que hace posible identificar proteínas o especies de proteínas poco abundantes que antes escapaban al límite de detección (Von Hagen et al., 2013). Resulta interesante el número de especies de actina 1 identificadas en epimastigotes. En metazoarios, las PTMs están relacionadas a localizaciones específicas en la célula (Hofmann et al., 2009; Karakozova et al., 2006; Puyal et al., 2013) y a la regulación de la interacción intermolecular de actina con otras proteínas, como las ABPs (proteínas de unión a actina), que están directamente relacionadas a la regulación de sus funciones (Dominguez et al., 2011; dos Remedios et al., 2003; Furukawa et al., 1997; Gandhi et al., 2008). Esto sugeriría que la regulación de la dinámica de actina en *T. cruzi* sería fundamentalmente por PTMs y no por la expresión de isoformas, como se ve en metazoarios (Perrin et al., 2010).

No observamos señal de actina 1 nuclear en imágenes de epifluorescencia (ver **Figura 11** y Apéndice 5) ni confocales (ver **Figura 13**) de la fracción núcleo-kinetoplasto-flagelar; tampoco se observó actina 1 nuclear en preparaciones de parásitos completos (ver **Figura 12** y Apéndice 3), que correlaciona bien con lo reportado por Cevallos et al., 2011; De Melo et al., 2008; De Souza et al., 1983; Kalb et al., 2013; pero contrasta con los hallazgos de Sahasrabudde et al. 2004, quienes identificaron actina en el núcleo de *L. donovani*, organismo estrechamente relacionado con *T. cruzi*, por ensayos de microscopía electrónica de inmuno-oro y ensayos de inmunofluorescencia confocal (Sahasrabudde et al., 2004). Esta diferencia podría explicarse por los diferentes métodos de permeabilización y fijación de la muestra (Schnell et al., 2012). Por otro lado, la falta de un marcador nuclear soluble no nos permite asegurar que no se haya comprometido la integridad de la envoltura nuclear y que de esta manera proteínas solubles, como actina, escapen de los núcleos durante el procesamiento de las muestras.

La obtención de núcleos puros no fue posible por ninguno de los dos métodos probados en esta tesis. El fraccionamiento celular en tripanosomátidos es complicado por la presencia del corset sub-pelicular (De Souza & Da Cunha-e-Silva, 2003). Nuestros resultados muestran que hay una fuerte relación entre el núcleo, el flagelo y el kinetoplasto de estos parásitos, que es difícil de romper con el uso de sustancias tensoactivas (Nonidet P-40) incluso con ayuda de disrupción mecánica (dounce), (ver **Figura 7**, **Figura 10**, **Figura 11**). En la bibliografía revisada solo están reportadas dos técnicas para la obtención de fracciones nucleares en tripanosomátidos (Rout et al., 2001; Shapiro et al., 1982). En ambos trabajos purifican los núcleos por gradiente de

densidad, Shapiro y Doxsey lo hacen en una columna de Percoll al 35% con sacarosa al 0.8 M, y Rout y Field lo hacen con sacarosa al 0.3 M con PVP al 8% (Rout et al., 2001). La desventaja de ambas técnicas es la contaminación de la fracción citoplasmática con la nuclear debido al uso de fuerzas mecánicas de cizallamiento o disrupción por cavitación que lisan el parásito de forma inespecífica. En ninguno de los dos trabajos reportados (Rout et al., 2001; Shapiro et al., 1982), que usan las técnicas antes mencionadas, se descartó la presencia de tubulina para confirmar o descartar la contaminación flagelar en las muestras extraídas, un contaminante importante como lo muestra nuestro trabajo en las fracciones nucleares del parásito. Nuestros intentos por purificar núcleos por gradiente de densidad con sacarosa 0.8 M (ver **Figura 9**) y Percoll 35% - sacarosa 0.75 M (ver **Figura 8**) mostraron resultados muy modestos, ya que en ambas preparaciones los flagelos completos o fragmentos de flagelos permanecen unidos a los núcleos. La fuerte unión entre el kinetoplasto y el flagelo podría estar relacionada a la presencia del “complejo de anclamiento tripartito” (Ralston et al., 2009), pero no hay una estructura descrita hasta el momento que explique la unión del kinetoplasto y/o flagelo al núcleo. Interesantemente, se sabe que actina ancla el cuerpo basal del flagelo al núcleo en *G. lamblia* (Benchimol, 2005), que es un protista parásito flagelado del grupo de los excavatas, al que también pertenece *T. cruzi*, lo que abre un interesante campo de estudio.

Otra dificultad técnica con los procesos de fraccionamiento en este modelo biológico es la falta de marcadores adecuados. Actualmente no se cuenta con marcadores comerciales específicos para tripanosomátidos. De los anticuerpos probados, solo el anti-EF1 α y anti-Histona H3 mostraron reconocimiento de bandas en el peso esperado para las proteínas en ensayos de WB. Sin embargo no fueron útiles en ensayos de inmunolocalización. Anti-Histona H3 presentó reconocimiento inespecífico a lo largo de todo el cuerpo del parásito. Anti-EF1 α mostró reconocimiento difuso a lo largo del cuerpo del parásito, comportamiento esperado, pero también a lo largo del flagelo, que sugiere una relación entre EF1 α y tubulina. Se ha reportado la relación de EF1 α y el citoesqueleto de tubulina en otros organismos (Clare et al., 1996), que podría explicar la presencia de EF1 α en la fracción nuclear, donde hay una importante contaminación flagelar.

Un hallazgo interesante, que resalta en las membranas teñidas con azul de Coomassie de ensayos de E2D es que actina no es una de las proteínas más abundantes de la célula (ver **Figura 14**), ni mucho menos la más abundante, como en otros eucariontes metazoarios (Oda et al., 2009; Pollard et al., 2003; Ruan et al., 2007) o incluso en protistas flagelados como *Trichomonas vaginalis* (Cuervo et al., 2008), miembro del grupo de excavatas. Considerando el pequeño número de ARPs, moléculas que modulan la actividad de actina, descrito para *T. cruzi* (De Melo et al., 2008) y la poca cantidad de esta proteína en *T. cruzi*, sugeriría que el sistema de actina en *T. cruzi* está

relacionado a un menor número de funciones (García-Salcedo et al., 2004; Nolan et al., 2008), en comparación a los metazoarios.

Existe una importante acumulación puntual de actina dentro del kinetoplasto del parásito y otro agregado independiente de actina en la región comprendida entre el kinetoplasto y la base del flagelo (ver **Figura 12** y **Figura 13**). Estos hallazgos incidentales, no son estrictamente el objetivo central del trabajo, pero es importante mencionarlo porque son ubicaciones de actina específicas y que no han sido reportadas hasta el momento. El agregado independiente de actina en la región comprendida entre el kinetoplasto y la base del flagelo, no parece pertenecer al bosillo falgelar (ver **Figura 12** y **Figura 13**), aunque sería necesario el uso de marcadores específicos para corroborar esto. Con el fraccionamiento de las muestras con Nonidet P-40 y la permeabilización con Triton X-100 (para los ensayos de inmunofluorescencia) observamos que la señal de actina en el kinetoplasto se pierde, pero no así el cúmulo entre el kinetoplasto y el flagelo (ver **Figura 12** y **Figura 13**), sugiriendo que este cúmulo está relacionado a un complejo resistente al tratamiento con detergentes. Interesantemente la única estructura reconocida en dicha zona es el segmento extramitocondrial del “Complejo tripartito” (TAC), que hasta el momento se desconoce su naturaleza bioquímica y está descrito simplemente como una estructura fibrilar electrodensa (Field et al., 2009; Gull, 1999; Langousis et al., 2014; Ralston et al., 2009).

Desafortunadamente no se llegó a terminar la caracterización de las especies de actina por espectrometría de masas, para determinar la naturaleza bioquímica de las especies. También sería recomendable el estudio de especies en fracciones de los otros dos estadios del parásito (tripomastigotes y amastigotes), ya que los resultados previos obtenidos en el laboratorio (Cevallos et al., 2011) sugieren la presencia de especies de actina estadio-específicas y que en *T. brucei* se ha demostrado que el silenciamiento de actina es letal en el estadio procíclico del parásito, mas no en su estadio sanguíneo (García-Salcedo et al., 2004).

XI. CONCLUSIÓN

Este trabajo sugiere que especies de actina poco abundantes tienen una distribución subcelular específica en epimastigotes de *T. cruzi*. Esto podría estar relacionado a la regulación de las funciones de actina 1 en estos compartimentos.

Los epimastigotes de *T. cruzi* expresan predominantemente seis especies de actina 1, con pI en el rango de 5.5-6.0.

Con el método de fraccionamiento de epimastigotes de *T. cruzi* con Nonidet P-40, se obtuvo una fracción citoplasmática enriquecida para proteínas citoplasmáticas solubles, mientras que la fracción nuclear correspondió a un enriquecido de proteínas núcleo-kinetoplasto-flagelares.

El núcleo de epimastigotes está fuertemente relacionado a su kinetoplasto y flagelo, hasta el momento no se ha descrito alguna estructura que explique la unión entre el núcleo con el flagelo o el núcleo con el kinetoplasto. Los resultados sugieren que actina 1 podría estar involucrado en estas relaciones.

Los resultados muestran la presencia de acumulaciones puntuales de actina 1, una dentro del kinetoplasto, y otra en la región comprendida entre el kinetoplasto y el cuerpo basal, que por su ubicación podría ser parte del TAC.

Bajo las condiciones probadas, el kit comercial NE-PER™ no fue adecuado para la obtención de fracciones citoplasmáticas y nucleares de *T. cruzi*.

Actina no es una de las proteínas más abundantes en epimastigotes de *T. cruzi*.

.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Beghini, D. G., Ferreira, A. T. D. S., Almeida, V. C. De, Caminha, M. A., Silva-Jr, F. P., Perales, J., & Menna-Barreto, R. F. S. (2012). New insights in *Trypanosoma cruzi* proteomic map: further post-translational modifications and potential drug targets in Y strain epimastigotes. *Journal of Integrated OMICS*, 2(2), 106–113. doi:10.5584/jiomics.v2i2.107
- Benchimol, M. (2005). The nuclei of *Giardia lamblia*--new ultrastructural observations. *Archives of Microbiology*, 183(3), 160–8. doi:10.1007/s00203-004-0751-8
- Boyer, L. A., & Peterson, C. L. (2000). Actin-related proteins (Arps): Conformational switches for chromatin-remodeling machines? *BioEssays*. doi:10.1002/1521-1878(200007)22:7<666::AID-BIES9>3.0.CO;2-Y
- Bremer, J. W., Busch, H., & Yeoman, L. C. (1981). Evidence for a species of nuclear actin distinct from cytoplasmic and muscles actins. *Biochemistry*, 20, 2013–2017.
- Carballido-López, R. (2006). The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 70(4), 888–909. doi:10.1128/MMBR.00014-06
- Carlén, L. M., Sánchez, F., Bergman, A. C., Becker, S., Hirschberg, D., Franzén, B., ... Ståhle, M. (2005). Proteome analysis of skin distinguishes acute guttate from chronic plaque psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 124, 63–69. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23501.x
- Cavalcanti, D. P., Shimada, M. K., Probst, C. M., Souto-Padrón, T. C. B. S., de Souza, W., Goldenberg, S., ... Motta, M. C. M. (2009). Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiology*, 9, 120. doi:10.1186/1471-2180-9-120
- Cevallos, A. M., López-Villaseñor, I., Espinosa, N., Herrera, J., & Hernández, R. (2003). *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Experimental Parasitology*, 103(1-2), 27–34. doi:10.1016/S0014-4894(03)00066-3
- Cevallos, A. M., Segura-Kato, Y. X., Merchant-Larios, H., Manning-Cela, R., Alberto Hernández-Osorio, L., Márquez-Dueñas, C., ... Hernández, R. (2011). *Trypanosoma cruzi*: multiple actin isovariants are observed along different developmental stages. *Experimental Parasitology*, 127(1), 249–59. doi:10.1016/j.exppara.2010.08.003
- Chadwick, B. P., Mull, J., Helbling, L. a, Gill, S., Leyne, M., Robbins, C. M., ... Slaugenhaupt, S. A. (1999). Cloning, mapping, and expression of two novel actin genes, actin-like-7A (ACTL7A) and actin-like-7B (ACTL7B), from the familial dysautonomia candidate region on 9q31. *Genomics*, 58(3), 302–309. doi:10.1006/geno.1999.5848
- Chaponnier, C., & Gabbiani, G. (2004). Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *Journal of Pathology*, 204, 386–395. doi:10.1002/path.1635

- Chen, F., Hersh, B. M., Conradt, B., Zhou, Z., Riemer, D., Gruenbaum, Y., & Horvitz, H. R. (2000). CED-4 to Nuclear Membranes During Programmed Cell Death. *Science*, 287(February), 1485–1489.
- Clore, A. M., Dannenhoffer, J. M., & Larkins, B. A. (1996). EF-1 alpha is associated with a Cytoskeletal Network surrounding protein bodies in maize endosperm cells. *The Plant Cell*, 8(11), 2003–2014. doi:10.1105/tpc.8.11.2003
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Britto, C., González, L. J., E Silva-Filho, F. C., Lopes, L. C., ... De Jesus, J. B. (2008). Differential soluble protein expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. *Journal of Proteomics*, 71, 109–122. doi:10.1016/j.jprot.2008.01.010
- De Melo, L. D. B., Sant'Anna, C., Reis, S. A., Lourenço, D., De Souza, W., Lopes, U. G., & Cunha-e-Silva, N. L. (2008). Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. *Parasitology*, 135(8), 955–65. doi:10.1017/S0031182008004496
- De Souza, W. (1984). Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology*, 86, 269–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860366>
- De Souza, W., & Da Cunha-e-Silva, N. L. (2003, January). Cell Fractionation of Parasitic Protozoa - A Review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. doi:10.1590/S0074-02762003000200001
- De Souza, W., Meza, I., Martinez-palomo, A., Sabanero, M., & Meirelles, M. N. L. (1983). *Trypanosoma cruzi*: Distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes. *Journal of Parasitology*, 69(1), 138–142.
- Díaz-Camino, C., Conde, R., Ovsenek, N., & Villanueva, M. a. (2005). Actin expression is induced and three isoforms are differentially expressed during germination in *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany*, 56(412), 557–565. doi:10.1093/jxb/eri034
- Díaz-Camino, C., & Villanueva, M. A. (1999). Purification of multiple functional leaf-actin isoforms from *Phaseolus vulgaris* L. *The Biochemical Journal*, 343 Pt 3, 597–602. doi:10.1042/0264-6021:3430597
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics*, 40, 169–86. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359
- Dopie, J., Skarp, K.-P., Rajakylä, E. K., Tanhuanpää, K., & Vartiainen, M. K. (2012). Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), E544–52. doi:10.1073/pnas.1118880109
- Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., & Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological Reviews*, 83(2), 433–73. doi:10.1152/physrev.00026.2002

- Elias, M. C., da Cunha, J. P. C., de Faria, F. P., Mortara, R. A., Freymüller, E., & Schenkman, S. (2007). Morphological Events during the *Trypanosoma cruzi* Cell Cycle. *Protist*, 158(December 2006), 147–157. doi:10.1016/j.protis.2006.10.002
- Field, M. C., & Carrington, M. (2009). The trypanosome flagellar pocket. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(11), 775–86. doi:10.1038/nrmicro2221
- Filtz, T. M., Vogel, W. K., & Leid, M. (2012). Regulation of transcription factor activity by interconnected, post-translational modifications. *NIH*, 29(6), 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
- Friedberg, I. (2006). Automated protein function prediction--the genomic challenge. *Briefings in Bioinformatics*, 7(3), 225–42. doi:10.1093/bib/bbl004
- Furukawa, R., & Fechheimer, M. (1997). The structure, function, and assembly of actin filament bundles. *International Review of Cytology*, 175, 29–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9203356>
- Galletta, B. J., Mooren, O. L., & Cooper, J. a. (2010). Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(5), 604–610. doi:10.1016/j.copbio.2010.06.006
- Gandhi, M., & Goode, B. L. (2008). The double-edge sword of actin dynamics. In C. S. Clemen, L. Eichinger, & V. Rybakin (Eds.), *The Coronin Family of Proteins* (pp. 72–87). Texas: Springer.
- Garcia-Bournissen, F., & Altcheh, J. (2011). Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 365(13), 1258–1259. doi:10.1056/NEJMc1108237
- García-Salcedo, J. a, Pérez-Morga, D., Gijón, P., Dilbeck, V., Pays, E., & Nolan, D. P. (2004). A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *The EMBO Journal*, 23(4), 780–9. doi:10.1038/sj.emboj.7600094
- Gieni, R. S., & Hendzel, M. J. (2009). Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 87(1), 283–306. doi:10.1139/O08-133
- Golubovskaya, V. M., Finch, R., & Cance, W. G. (2005). Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25008–21. doi:10.1074/jbc.M414172200
- Gomez, T. M., & Letourneau, P. C. (2014). Actin dynamics in growth cone motility and navigation. *Journal of Neurochemistry*, 129(2), 221–234. doi:10.1111/jnc.12506
- Goodson, H. V, & Hawse, W. F. (2002). Molecular evolution of the actin family. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 13), 2619–2622.

- Gordon, J. L., Buguliskis, J. S., Buske, P. J., & Sibley, L. D. (2010). Actin-Like Protein 1 (ALP1) is a component of dynamic, high molecular weight complexes in *Toxoplasma gondii*. *Cytoskeleton*, 67(1), 23–31. doi:10.1002/cm.20414
- Gordon, J. L., & Sibley, L. D. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics*, 6, 179. doi:10.1186/1471-2164-6-179
- Gull, K. (1999). The cytoskeleton of Trypanosomatid parasites. *Annual Review of Microbiology*, 53, 629–655. doi:10.1146
- Hernández, R., Cevallos, A. M., Nepomuceno-Mejía, T., & López-Villaseñor, I. (2012). Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. *Parasitology Research*, 111(2), 509–14. doi:10.1007/s00436-012-2974-y
- Hirono, M., Uryu, S., Ohara, A., Kato-Minoura, T., & Kamiya, R. (2003). Expression of conventional and unconventional actins in *Chlamydomonas reinhardtii* upon deflagellation and sexual adhesion. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 486–493. doi:10.1128/EC.2.3.486-493.2003
- Hofmann, W. A. (2009). Cell and molecular biology of nuclear actin. In *International review of cell and molecular biology* (1st ed., Vol. 273, pp. 219–63). Elsevier Inc. doi:10.1016/S1937-6448(08)01806-6
- Hofmann, W. A., Arduini, A., Nicol, S. M., Camacho, C. J., Lessard, J. L., Fuller-Pace, F. V., & De Lanerolle, P. (2009). SUMOylation of nuclear actin. *Journal of Cell Biology*, 186(2), 193–200. doi:10.1083/jcb.200905016
- Huang, J., & Van der Ploeg, L. H. (1991). Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *The EMBO Journal*, 10(12), 3877–85.
- Huber, L. a, Pfaller, K., & Vietor, I. (2003). Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circulation Research*, 92(9), 962–8. doi:10.1161/01.RES.0000071748.48338.25
- Jiang, L., He, L., & Fountoulakis, M. (2004). Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*, 1023(2), 317–320. doi:10.1016/j.chroma.2003.10.029
- Jiang, Y.-Q., & Zhao, W.-L. (2002). Expression and Phylogenetic Analysis of Pea Actin Isoforms. *Acta Botanica Sinica*, 44(12), 1456–1461.
- Kalb Souza, L. C., Goncalves Goncalves Pinho, R. E., de Paula Lima, C. V., Perdião Fragoso, S., & Soares, M. J. (2013). Actin expression in trypanosomatids (Euglenozoa: Kinetoplastea). *Memories Institute Oswaldo Cruz*, 108(August), 631–636. doi:10.1590/0074-0276108052013015
- Kamoun-Essghaier, S., Guizani, I., Strub, J. M., Van Dorsselaer, A., Mabrouk, K., Ouelhazi, L., & Dellagi, K. (2005). Proteomic approach for characterization of immunodominant membrane-associated 30- to 36-kiloDalton fraction antigens of *Leishmania infantum* promastigotes,

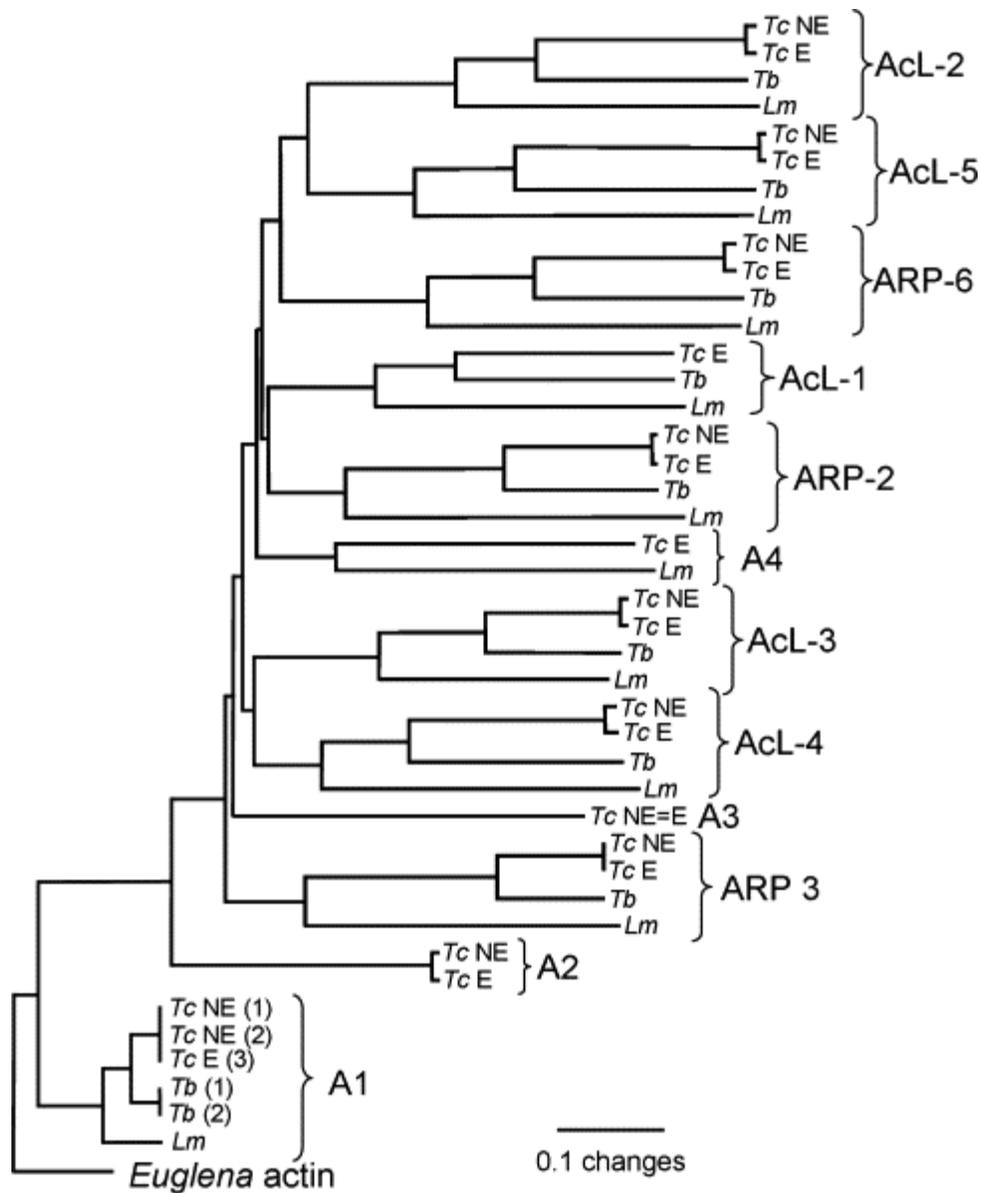
- reacting with sera from Mediterranean visceral leishmaniasis patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(2), 310–20. doi:10.1128/CDLI.12.2.310-320.2005
- Karakozova, M., Kozak, M., Wong, C. C. L., Bailey, A. O., Yates, J. R., Mogilner, A., ... Kashina, A. (2006). Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5784), 192–196. doi:10.1126/science.1129344
- Kato-Minoura, T., Okumura, M., Hirono, M., & Kamiya, R. (2003). A Novel Family of Unconventional Actins in *Volvoclean Algae*. *Journal of Molecular Evolution*, 57(5), 555–561. doi:10.1007/s00239-003-2509-3
- Kaur, K. J., & Ruben, L. (1994). Protein translation elongation factor-1 alpha from *Trypanosoma brucei* binds calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(37), 23045–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8083206>
- Kim, M. Y., Bae, J. S., Kim, T. H., Park, J. M., & Ahn, Y. H. (2012). Role of transcription factor modifications in the pathogenesis of insulin resistance. *Experimental Diabetes Research*, 2012. doi:10.1155/2012/716425
- Kirchhoff, L. V. (2011). Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). *Advances in Parasitology*, 75, 1–18. doi:10.1016/B978-0-12-385863-4.00001-0
- Krebs, J. F., Goldstein, E. S., & Kilpatrick, S. T. (2014). *Lewin's GENES XI* (11th ed.). Massachusetts: Jones & Bartlett Learning.
- Kumar, D., Minocha, N., Rajanala, K., & Saha, S. (2009). The distribution pattern of proliferating cell nuclear antigen in the nuclei of *Leishmania donovani*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 11), 3748–57. doi:10.1099/mic.0.033217-0
- Kuroda, M. (1985). Change of actin isomers during differentiation of smooth muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 843, 208–213.
- Langousis, G., & Hill, K. L. (2014). Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(7), 505–18. doi:10.1038/nrmicro3274
- López, J. L. (2007). Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 849, 190–202. doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.049
- Ma, X., Wildgruber, R., Bauer, J., Weber, G., Infanger, M., Grosse, J., & Grimm, D. (2012). The use of sigmoid pH gradients in free-flow isoelectric focusing of human endothelial cell proteins. *Electrophoresis*, 33, 1349–1355. doi:10.1002/elps.201100598
- Marques Porto, R., Amino, R., Elias, M. C. Q., Faria, M., & Schenkman, S. (2002). Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 119(2), 265–71.
- Martinez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., & Myler, P. J. (2004). Transcription Initiation and Termination on *Leishmania major* Chromosome 3. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 506–517. doi:10.1128/EC.3.2.506-517.2004

- Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S., Fox, M., Stuart, K., & Myler, P. J. (2001). Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *116*(2), 147–57.
- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., & Myler, P. J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular Cell*, *11*(5), 1291–9.
- Minocha, N., Kumar, D., Rajanala, K., & Saha, S. (2011). Kinetoplast morphology and segregation pattern as a marker for cell cycle progression in *Leishmania donovani*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *58*(3), 249–253. doi:10.1111/j.1550-7408.2011.00539.x
- Moncayo, Á., & Silveira, A. C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memories Institute Oswaldo Cruz*, *104*(May), 17–30.
- Mortara, R. a. (1989). Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. *The Journal of Protozoology*, *36*(1), 8–13.
- Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. (2013). Diagnostico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiológicas Clínicas*, *31*(Supl 1), 26–34.
- Nepomuceno-Mejía, T., Lara-Martínez, R., Cevallos, A. M., López-Villaseñor, I., Jiménez-García, L. F., & Hernández, R. (2010). The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. *FEMS Microbiology Letters*, *313*(1), 41–6. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02117.x
- Nolan, D. P., & Garcia-Salcedo, J. A. (2008). Loss of actin does not affect export of newly synthesized proteins to the surface of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *157*(2), 233–5. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.10.006
- North, a J., Gimona, M., Lando, Z., & Small, J. V. (1994). Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells. *Journal of Cell Science*, *107* (Pt 3, 445–455.
- Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y., & Narita, A. (2009). The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature*, *457*(7228), 441–5. doi:10.1038/nature07685
- Oh, S. D., Park, S. Y., Park, J. Il, Chun, S. Y., Ryu, T. H., & Soh, J. (2013). The novel, actin-like protein Tact3 is expressed in rodent testicular haploid germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, *80*(12), 988–999. doi:10.1002/mrd.22262
- Perrin, B. J., & Ervasti, J. M. (2010). The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, *67*(10), 630–4. doi:10.1002/cm.20475
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, *112*(4), 453–65.

- Puyal, J., Ginet, V., & Clarke, P. G. H. (2013). Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: A challenge for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, *105*, 24–28. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.03.002
- Ralston, K. S., Kabututu, Z. P., Melehani, J. H., Oberholzer, M., & Hill, K. L. (2009). The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 335–62. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073353
- Rassi jr, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, *375*, 1388–1402.
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A., & Aslund, L. (2008). Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(23), 15884–92. doi:10.1074/jbc.M802081200
- Rocha, G. M., Brandão, B. A., Mortara, R. A., Attias, M., De Souza, W., & Carvalho, T. M. U. (2006). The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Journal of Structural Biology*, *154*, 89–99. doi:10.1016/j.jsb.2005.11.008
- Rocha, G. M., Miranda, K., Weissmüller, G., Bisch, P. M., & de Souza, W. (2008). Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* revisited by atomic force microscopy. *Microscopy Research and Technique*, *71*(2), 133–9. doi:10.1002/jemt.20535
- Rout, M. P., & Field, M. C. (2001). Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*. Identification of a major repetitive nuclear lamina component. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(41), 38261–71. doi:10.1074/jbc.M104024200
- Ruan, W., & Lai, M. (2007). Actin, a reliable marker of internal control? *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *385*(1-2), 1–5. doi:10.1016/j.cca.2007.07.003
- Rubenstein, P. a, & Wen, K.-K. (2005). Lights, camera, actin. *IUBMB Life*, *57*(10), 683–7. doi:10.1080/15216540500306991
- Sahasrabudde, A. A., Bajpai, V. K., & Gupta, C. M. (2004). A novel form of actin in Leishmania: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *134*(1), 105–114. doi:10.1016/j.molbiopara.2003.11.008
- Sakurai, N., & Utsumi, T. (2006). Posttranslational N-myristoylation is required for the anti-apoptotic activity of human tGelsolin, the C-terminal caspase cleavage product of human gelsolin. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(20), 14288–14295. doi:10.1074/jbc.M510338200
- Schlüter, H., Apweiler, R., Holzhütter, H.-G., & Jungblut, P. R. (2009). Finding one's way in proteomics: a protein species nomenclature. *Chemistry Central Journal*, *3*, 11. doi:10.1186/1752-153X-3-11
- Schnell, U., Dijk, F., Sjollem, K. a, & Giepmans, B. N. G. (2012). Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nature Methods*, *9*(2), 152–158. doi:10.1038/nmeth.1855

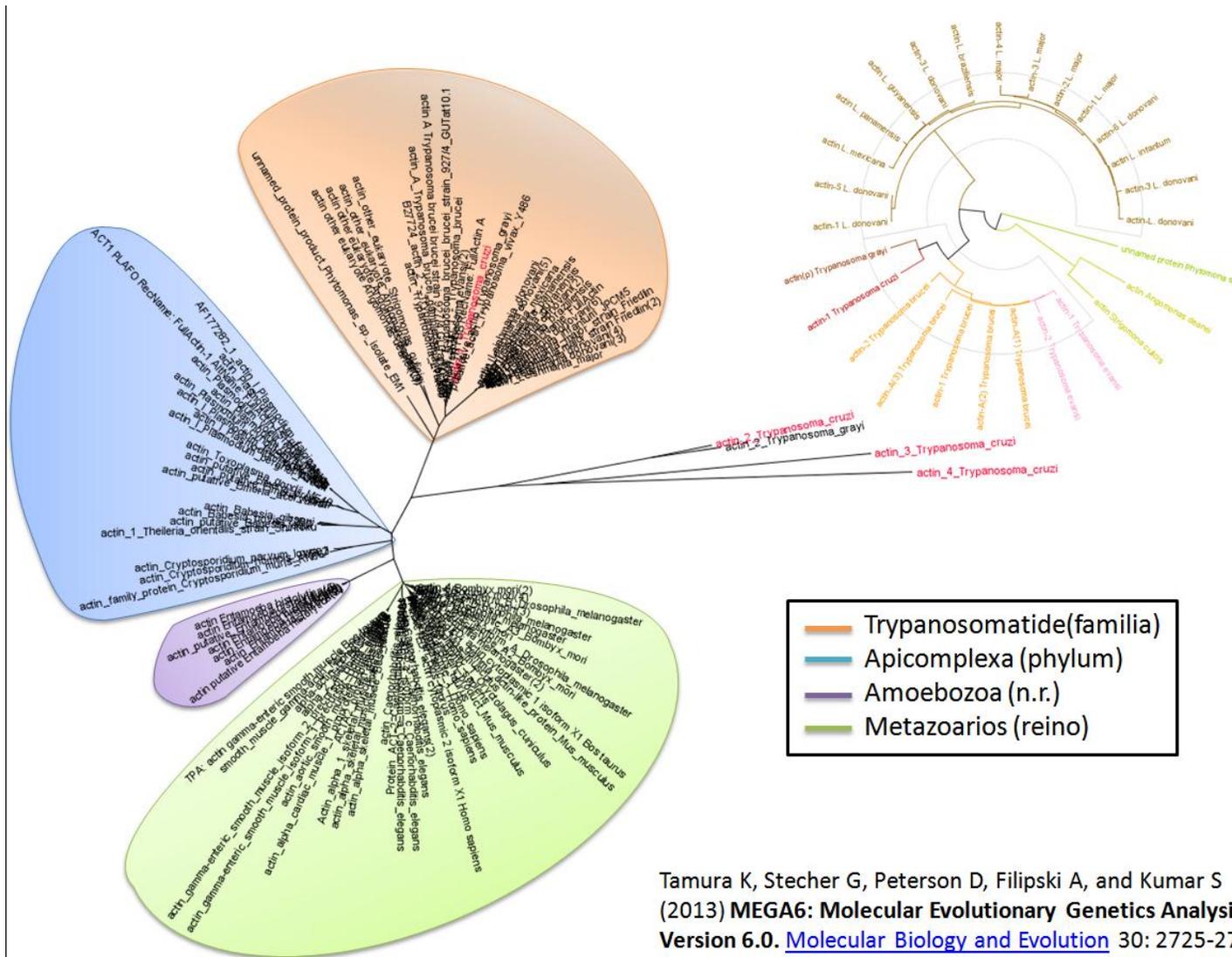
- Shapiro, S. Z., & Doxsey, S. J. (1982). Purification of nuclei from a flagellate protozoan, *Trypanosoma brucei*. *Analytical Biochemistry*, 127(1), 112–5.
- Solito, E., Christian, H. C., Festa, M., Mulla, a., Tierney, T., Flower, R. J., & Buckingham, J. C. (2006). Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(9), 1498–1500. doi:10.1096/fj.05-5319fje
- Terman, J. R., & Kashina, A. (2013). Post-translational modification and regulation of actin. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(1), 30–8. doi:10.1016/j.ceb.2012.10.009
- Tsuji, N., Fukuda, K., Nagata, Y., Okada, H., Haga, A., Hatakeyama, S., ... Itoh, H. (2014). The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90. *FEBS Open Bio*, 4, 796–803. doi:10.1016/j.fob.2014.09.003
- Utsumi, T., Sakurai, N., Nakano, K., & Ishisaka, R. (2003). C-terminal 15 kDa fragment of cytoskeletal actin is posttranslationally N-myristoylated upon caspase-mediated cleavage and targeted to mitochondria. *FEBS Letters*, 539(1-3), 37–44. doi:10.1016/S0014-5793(03)00180-7
- Valdillo-Mata, J. (2009). Clonación y caracterización de un gene atípico de actina de *Trypanosoma cruzi*. Tesis (Maestra en Ciencias Biológicas). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Von Hagen, J., & Michelsen, U. (2013). Cellular fractionation-mammalian cells. *In Methods in enzymology* (Vol. 533, pp. 25–30). doi:10.1016/B978-0-12-420067-8.00003-9
- Zechel, K., & Weber, K. (1978). Actins from mammals, bird, fish and slime mold characterized by isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 89, 105–112.
- Zingales, B., Miles, M. a, Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., ... Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(2), 240–53. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009
- Zuma, A. A., Mendes, I. C., Reignault, L. C., Elias, M. C., De Souza, W., Machado, C. R., & Motta, M. C. M. (2014). How *Trypanosoma cruzi* handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase i inhibitor. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 193(2), 93–100. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.02.001

XIII. ANEXOS



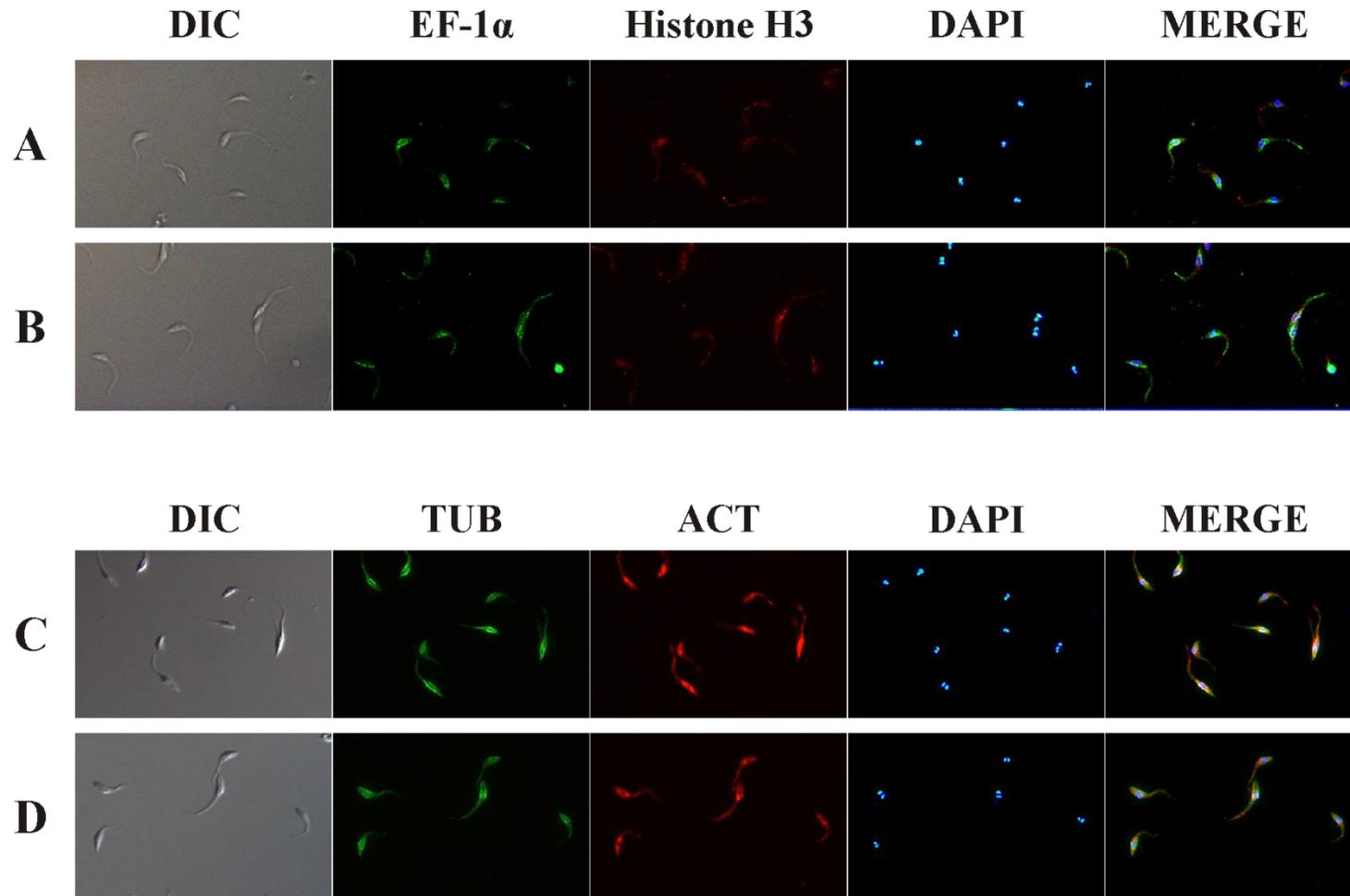
APÉNDICE 1 NEIGHBOUR JOINING TREE DE ACTINA, PROTEÍNAS RELACIONADAS A ACTINA Y PROTEÍNAS PARECIDAS A ACTINA DE TRIPANOSOMÁTIDOS

Tc: *T. cruzi*, *Tb*: *T. brucei*, *Lm*: *L. major*, A: actina, ARP: proteínas relacionadas a actina, AcL: proteínas parecidas a actina Tomado de (Cevallos et al., 2011).



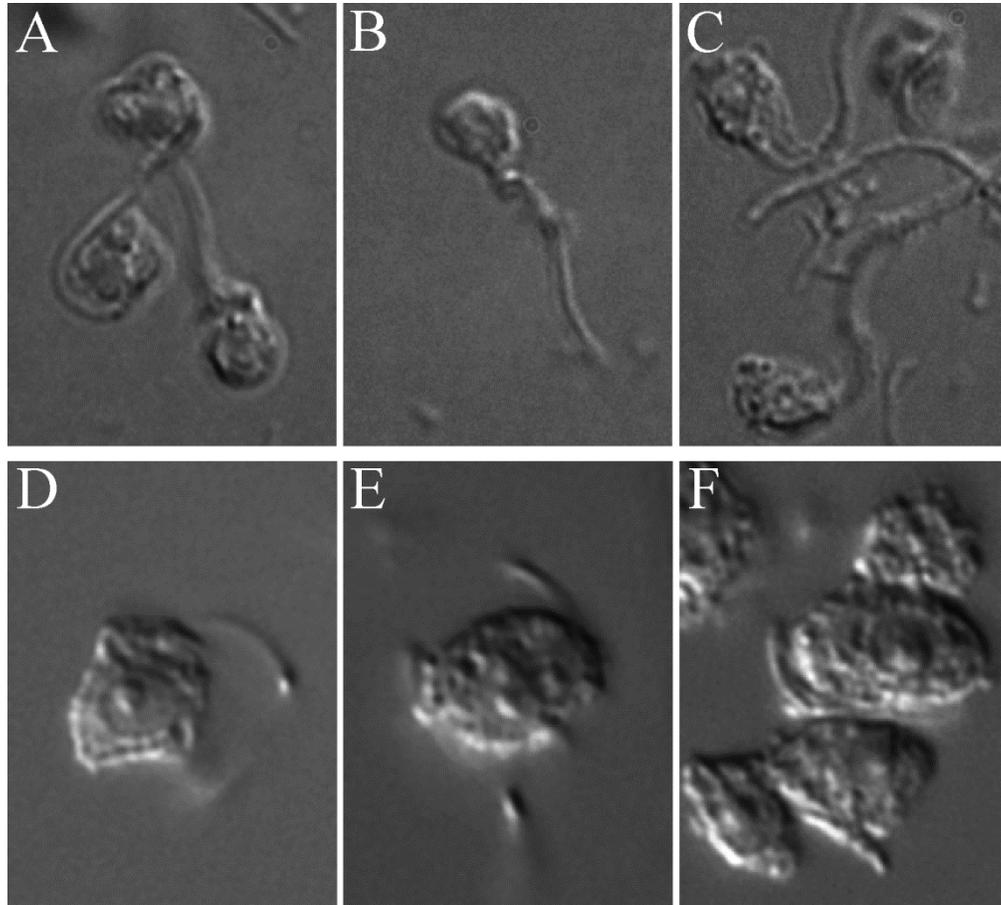
APÉNDICE 2 NEIGHBOUR JOINING TREE DE 180 SECUENCIAS DE ACTINA EN DIFERENTES GRUPOS DE METAZOARIOS

Análisis filogenético de 180 secuencias de aminoácidos de actina de varios organismos, desde hongos hasta mamíferos, incluyendo levaduras, protozoarios, insectos, aves. En rojo se observa la actina de *T. cruzi* 1, 2, 3 y 4. La actina 1 de *T. cruzi* es la única que agrupa con las actinas del grupo de tripanosomátidos. La actina 2-4 quedan distantes del grupo de actinas de tripanosomátidos y de cualquier otro grupo de actinas. En la parte superior derecha se observa una proyección radial del grupo de actinas de tripanosomátidos.



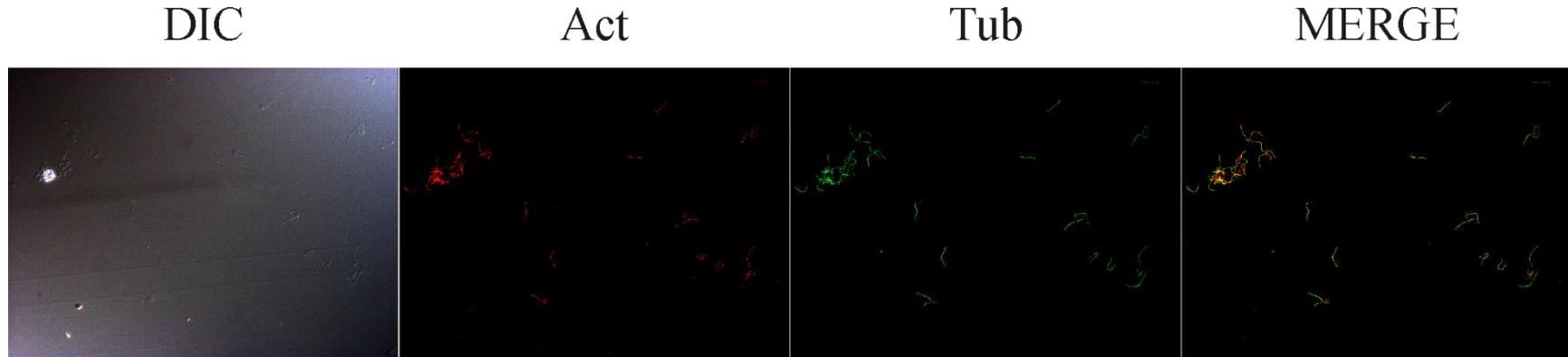
APÉNDICE 3 MICROFOTOGRAFÍAS DE EPIFLUORESCENCIA DE EPIMASTIGOTES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN FASE MEDIA LOGARÍTMICA.

Microfotografías 40X de epimastigotes de *T. cruzi* en campo claro con contraste de interferencia diferencial -**DIC** (Filas A-D), incubados con anticuerpo primario anti-EF1 α 1:800 - **EF-1 α** (Filas A y B), anticuerpo primario anti-Histona H3 - **Histona H3** (Filas A y B), anticuerpo primario anti-tubulina 1:800 - **Tub** (Filas C y D), anticuerpo primario anti-Actina 1 de *T. cruzi* - **ACT** (Filas C y D); los núcleos fueron teñidos con DAPI 1:1,000 - **DAPI** (Filas A-D). En la última columna se presenta el *merge* de las imágenes de fluorescencia (Filas A-D).



APÉNDICE 4 Microscopía con DIC de la fracción nuclear obtenida por el fraccionamiento en Nonidet P-40 al 0.5%, purificada por gradiente de densidad.

Microfotografías en DIC a 100X que muestran la purificación de fracciones nucleares (enriquecidos núcleo-kinetoplasto-flagelares) de epimastigotes obtenidas con Nonidet P-40 al 0.5% purificadas en un colchón de sacarosa al 0.8 M (Paneles A, B y C) y en un colchón de Percoll 35% - sacarosa 0.75 M (Paneles D, E y F). El flagelo permanece unido al núcleo en ambos protocolos. Nótese los artefactos que produce el Percoll adherido a la cara externa de la envoltura nuclear, que no solo disimula la presencia de los flagelos que permanecen unidos a los núcleos, sino que también los mismo núcleos aparentan tener un diámetro mucho mayor, casi dos o tres veces superior al real (si se compara con los núcleos de los páneles A, B, y C).



APÉNDICE 5 MICROFOTOGRAFIAS DE EPIFLUORESCENCIA DE FRACCIÓN NUCLEAR (ENRIQUECIDOS NÚCLEO-KINETOPLASTO-FLAGELO) DE EPIMASTIGOTES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, OBTENIDOS POR FRACCIONAMIENTO EN NONIDET P-40 AL 0.5%

Epifluorescencias 40X de fracción nuclear (enriquecidos núcleo-kinetoplasto-flagelo) obtenidos por fraccionamiento en Nonidet P-40. Se muestra una imagen representativa de los ensayos, donde resalta que prácticamente la totalidad de la señal de actina (color rojo) colocaliza con la de tubulina (color verde) a lo largo del flagelo.

XIV. ABREVIATURAS

E2D: Ensayos de electroforesis en doble dimensión

EF1 α : Factor de elongación 1 alpha.

IEF: Isoelectroenfoque

pI: Punto isoelectrico

WB: Ensayo de Western blot

TCA: Ácido tricloroacético

DOC: Deoxicolato