

+ 4/121

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 18/12/2002  
ENTRADA NUM. 5229

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
**05 DIC. 2002**  
COMISION DE DOCTORADO



# Disección molecular y funcional del producto del gen *LYT1* de *Trypanosoma cruzi*

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**  
**GRANADA**  
Nº Documento 613524835  
Nº Copia 15502053



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra"

Elena González Rey Granada 2002



Universidad de Granada

**Disección molecular y funcional  
del producto del gen *LYT1* de  
*Trypanosoma cruzi***

**Tesis Doctoral  
Elena González Rey  
Instituto de Parasitología y Biomedicina (CSIC)  
Granada 2002**

**Diseción molecular y funcional  
del producto del gen *LYT1* de  
*Trypanosoma cruzi***

**Memoria presentada por la Licenciada  
Elena González Rey para optar al grado  
de Doctora en Biología**



**Elena González Rey**

**Granada 2002**

# **Diseción molecular y funcional del producto del gen *LYT1* de *Trypanosoma cruzi***

**Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Parasitología  
Y Biomedicina (C.S.I.C), bajo la direccin  
del Dr. Antonio González Aguilar, Colaborador Científico  
Del Consejo Superior de Investigaciones Científicas**



**Antonio González Aguilar**

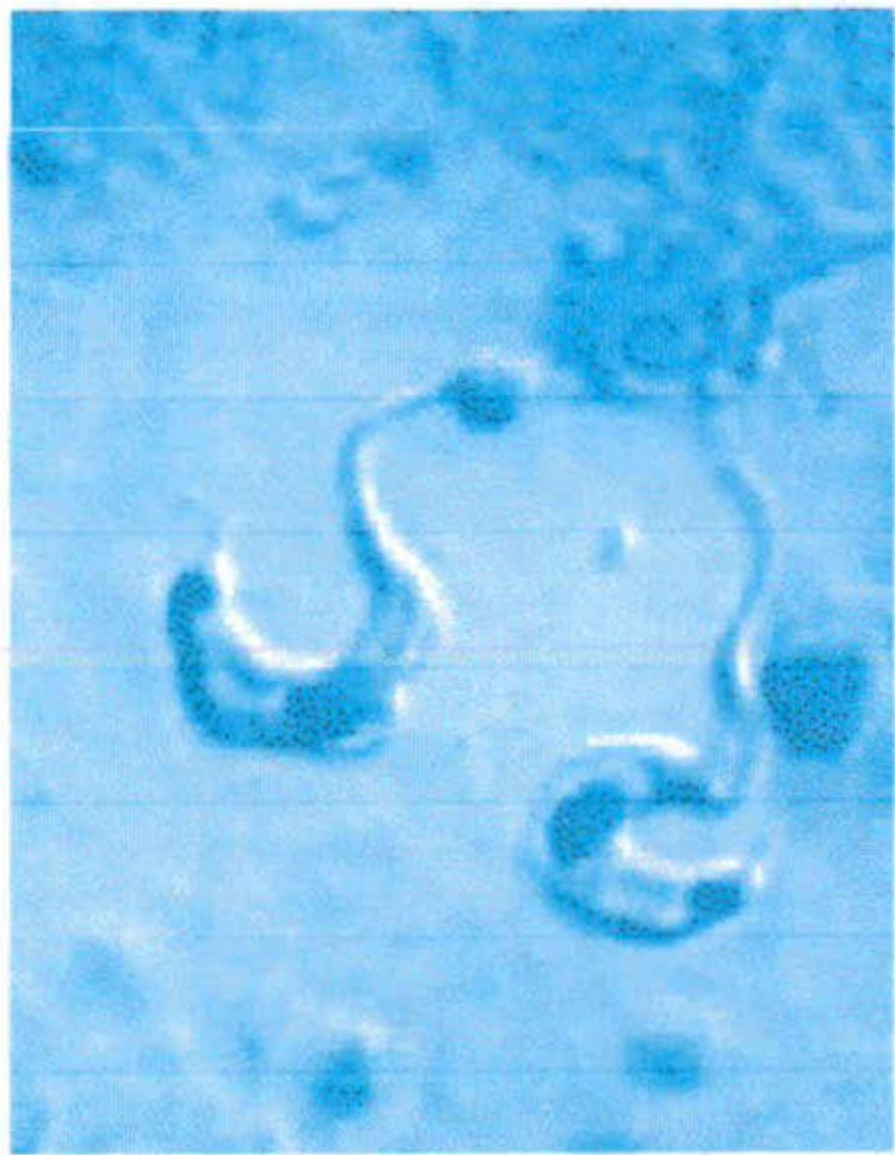
**Colaborador Científico (C.S.I.C)**

# **Disección molecular y funcional del producto del gen *LYT1* de *Trypanosoma cruzi***

**Parte de los resultados de esta Tesis se  
encuentran recogidos en los artículos siguientes:**

**Manning-Cela, R.; Cortés, A.; González-Rey, E.; Van Voorhis, W.; Swindle, J.; González, A;  
“*LYT1* protein is required for efficient *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*”.  
(2001) *Infect. Immun.* 69(6)**

**Manning-Cela, R.; González, A.; Swindle, J.;  
“*Alternative splicing of LYT1 transcripts in Trypanosoma cruzi*”.  
(2002) *Infect. Immun.* 70(8)**



# Índice



## ÍNDICE

<b>I</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
II.1	TAXONOMIA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	3
II.1.1	<i>Orden Kinetoplastidae.....</i>	3
II.1.2	<i>Familia Trypanosomatidae. Género Trypanosoma. ....</i>	4
II.1.3	<i>Características celulares o morfológicas. ....</i>	5
II.1.4	<i>Metabolismo de los tripanosomátidos. ....</i>	10
II.1.5	<i>Características moleculares o genéticas. ....</i>	10
II.2	TRYPANOSOMA CRUZI.....	25
II.2.1	<i>Ciclo de vida. ....</i>	26
II.2.2	<i>La enfermedad de Chagas ....</i>	29
II.2.3	<i>Profilaxis y Quimioterapia ....</i>	32
II.3	LA INVASIÓN POR EL PROTOZOO PARÁSITO TRYPANOSOMA CRUZI.....	34
II.3.1	<i>La Infección De Células De Mamíferos Por T. cruzi.....</i>	34
II.3.2	<i>Invasión de células fagocíticas por T. cruzi.....</i>	34
II.3.3	<i>Invasión de células no fagocíticas por T. cruzi.....</i>	36
II.4	ACONTECIMIENTOS EN LA INVASIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI.....	41
II.4.1	<i>Interacción del parásito con la célula hospedadora. ....</i>	41
II.4.2	<i>Entrada de T. cruzi en la célula hospedadora.....</i>	45
II.4.3	<i>Escape del parásito al citosol.....</i>	50
II.4.4	<i>Etapa citosólica.....</i>	56
II.5	PROTEÍNAS FORMADORAS DE POROS.....	57
II.6	APÉNDICE I: GENERACIÓN DE MUTANTES NULOS PARA EL GEN LYT1.....	64
<b>III</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>IV</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
IV.1	MATERIAL.....	66
IV.1.1	<i>Líneas celulares.....</i>	66



IV.1.2	<i>Medios de cultivo</i> .....	66
IV.1.3	<i>Productos químicos</i> .....	68
IV.1.4	<i>Reactivos para Biología Molecular</i> .....	68
IV.1.5	<i>Tampones y soluciones</i> .....	69
IV.1.6	<i>Patrones de pesos moleculares para electroforesis</i> .....	70
IV.1.7	<i>Oligonucleótidos</i> .....	71
IV.1.8	<i>Vectores y construcciones</i> .....	72
IV.1.9	<i>Instrumentación</i> .....	73
IV.1.10	<i>Aplicaciones informáticas</i> .....	75
IV.2	<b>MÉTODOS</b> .....	77
IV.2.1	<i>Técnicas de Biología Celular</i> .....	77
IV.2.1.1	Cultivo “in vitro” de <i>T. cruzi</i> .....	77
IV.2.1.2	Cultivo “in vitro” de <i>Leishmania tropica</i> .....	79
IV.2.1.3	Cultivo in vitro de <i>Phytomonas serpens</i> T10 .....	80
IV.2.1.4	Obtención de sobrenadantes de parásitos.....	80
IV.2.1.5	Obtención de proteínas totales de parásitos .....	81
IV.2.1.6	Fraccionamiento celular.....	81
IV.2.1.7	Cultivo “in vitro” de líneas celulares eucariotas.....	81
IV.2.1.8	Transfección de parásitos por electroporación .....	82
IV.2.1.9	Infecciones de células eucarióticas por parásitos .....	84
IV.2.2	<i>Técnicas de Biología Molecular</i> .....	85
IV.2.2.1	Cultivo y manipulación de bacterias.....	85
IV.2.2.2	Purificación de DNA.....	87
IV.2.2.3	Cuantificación de Ácidos Nucleicos.....	89
IV.2.2.4	Tratamientos enzimáticos del DNA.....	89
IV.2.2.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	91
IV.2.2.6	Electroforesis de ácidos nucleicos .....	92
IV.2.2.7	Aislamiento de DNA de geles de agarosa.....	92
IV.2.2.8	Secuenciación de DNA .....	93
IV.2.3	<i>Técnicas de Análisis proteico e inmunológicas</i> .....	94
IV.2.3.1	Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) .....	94





IV.2.3.2	Transferencia a membranas de proteínas separadas por SDS-PAGE (“Western Blot”).....	96
IV.2.3.3	Precipitación de proteínas .....	96
IV.2.3.4	Expresión de proteínas en E. coli .....	97
IV.2.3.5	Cuantificación de proteínas .....	100
IV.2.3.6	Conjugación de proteínas a CNBr-Sepharose 4B.....	101
IV.2.3.7	Obtención de anticuerpos .....	102
IV.2.3.8	Técnicas serológicas .....	104
IV.2.3.9	Inmunofluorescencia en parásitos.....	105
IV.2.3.10	Ensayos hemolíticos .....	108
<b>V</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>110</b>
V.1	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN LYT1 .....	110
V.1.1	<i>Antecedentes: Aislamiento, secuenciación y organización del gen LYT1 ...</i>	<i>110</i>
V.1.2	<i>Análisis molecular de los alelos del gen LYT1 .....</i>	<i>113</i>
V.1.2.1	Clonaje de los alelos LYT1a y LYT1b.....	113
V.1.2.2	Secuenciación de los clones pCR-Blunt- LYT1a y pCR-Blunt-LYT1b.....	117
V.1.2.3	Análisis de la secuencia de los alelos LYT1a y LYT1b .....	117
V.1.3	<i>Transcripción y procesamiento del gen LYT1 .....</i>	<i>121</i>
V.1.3.1	Splicing alternativo del gen LYT1 .....	121
V.1.3.2	Expresión de los transcritos de LYT1 durante el ciclo de vida del parásito. .....	124
V.2	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CONSTRUCCIONES DEL GEN LYT1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS .....	127
V.2.1	<i>Construcción de los sistemas de expresión pGEX-2T-LYT1 <math>\delta</math>ss y pGEX-2T-LYT1Ct .....</i>	<i>127</i>
V.2.2	<i>Purificación de los péptidos LYT1 <math>\delta</math>ss y LYT1Ct.....</i>	<i>129</i>
V.3	EXPRESIÓN DE LYT1 EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DEL PARÁSITO .....	135
V.3.1	<i>Inmunodetección de la proteína nativa.....</i>	<i>135</i>
V.3.2	<i>Localización celular de los transcritos de LYT1 en el parásito.....</i>	<i>138</i>
V.4	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL GEN LYT1.....	139
V.4.1	<i>Participación de LYT1 en el proceso de infección.....</i>	<i>139</i>



V.4.1.1	Comportamiento de tripomastigotes en infecciones primarias. Comparación entre parásitos mutantes y salvajes. ....	139
V.4.1.2	Acontecimientos intracelulares ocurridos en la invasión. ....	142
V.4.2	<i>Participación de LYT1 en el ciclo de vida del parásito.</i> .....	150
V.4.2.1	Influencia del gen LYT1 en el cambio de estadio durante el ciclo de vida .....	150
V.5	RECONSTITUCIÓN DIFERENCIAL DE LOS MUTANTES NULOS .....	152
V.5.1	<i>Construcción del sistema de expresión en pTEXble</i> .....	152
V.5.2	<i>Transfección de T. cruzi con pTEXble-LYT1 y pTEXble-LYT1<math>\delta</math>atg.</i> .....	156
V.5.3	<i>Análisis de parásitos transfectados.</i> .....	156
V.5.3.1	Expresión de pTEXble-LYT1 y pTEXble-LYT1 $\delta$ atg en T. cruzi.....	156
V.5.3.2	Análisis de la transición de estadio en los parásitos transfectados. ....	159
V.5.3.3	Actividad hemolítica de las líneas L16pTEXble-LYT1 y L16pTEXble-LYT1 $\delta$ atg .....	161
V.5.3.4	Análisis de la infectividad de los mutantes nulos transfectados .....	163
V.6	EXPRESIÓN DE LYT1 EN LEISHMANIA TROPICA.....	168
V.6.1	<i>Construcción del sistema de expresión px63NEOLYT1.</i> .....	168
V.6.2	<i>Transfección de L. tropica con el gen LYT1.</i> .....	169
V.6.3	<i>Análisis de la expresión de LYT1 en las leishmanias transfectadas.</i> .....	169
V.6.4	<i>Análisis de la actividad hemolítica.</i> .....	171
V.6.5	<i>Análisis de la infectividad de las leishmanias transfectadas.</i> .....	172
V.7	EXPRESIÓN DE LYT1 EN PHYTOMONAS.....	175
V.7.1	<i>Transfección de P.serpens con pTEXble-LYT1.</i> .....	175
V.7.2	<i>Análisis de la expresión de LYT1 en los parásitos transfectados.</i> .....	175
V.7.3	<i>Análisis de la actividad hemolítica.</i> .....	177
V.7.4	<i>Ensayo de infección con P.serpens expresando la proteína LYT1.</i> .....	177
VI	<b>DISCUSIÓN</b> .....	180
VI.1	ANÁLISIS DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE LOS ALELOS A Y B DEL GEN LYT1	180
VI.2	TRANSCRIPCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL GEN LYT1.....	183
VI.3	ESTRUCTURA PRIMARIA Y MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LYT1	189
VI.4	EXPRESIÓN DE LYT1.....	196
VI.5	LOCALIZACIÓN DE LYT1.....	202



<b>VI.6</b>	<b>CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LYT1 .....</b>	<b>211</b>
VI.6.1	<i>Actividad lítica de la proteína LYT1 .....</i>	<i>211</i>
VI.6.2	<i>Actividad biológica de LYT1 en el proceso de infección celular .....</i>	<i>213</i>
VI.6.3	<i>Escape del parásito de la vacuola fagolisosómica.....</i>	<i>219</i>
VI.6.4	<i>Cambio de estadio.....</i>	<i>223</i>
VI.6.5	<i>Significado biológico de la actividad del gen LYT1.....</i>	<i>227</i>
<b>VII</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>231</b>
<b>VIII</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>233</b>



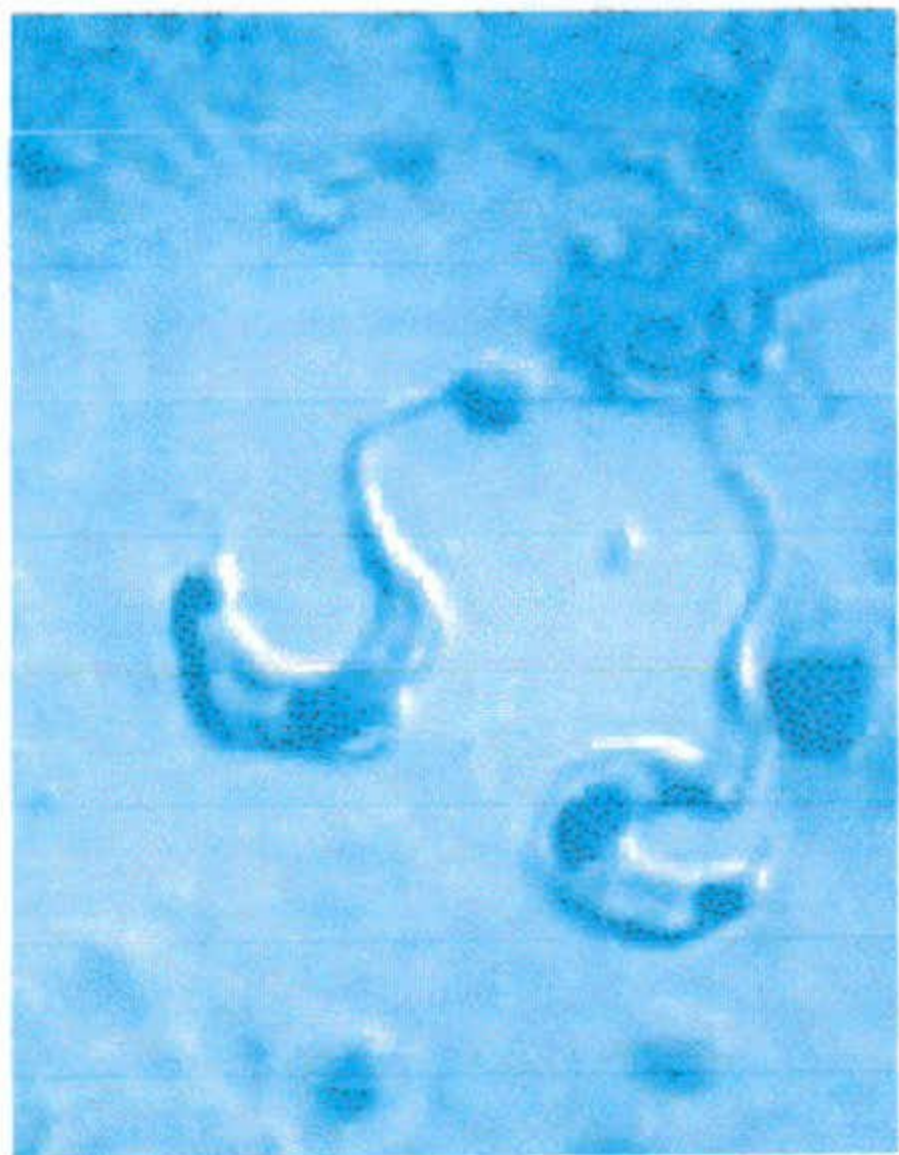
## ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BCIP</b>	5-bromo, 4 cloro, 3 indolil fosfato
<b>BPB</b>	Azul de Bromofenol
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>C9</b>	Componente terminal de la cadena del complemento C9
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CFA</b>	Adyuvante completo de Freund
<b>col</b>	Colaboradores
<b>CNBr</b>	Bromuro de cianógeno
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAG</b>	Diacil glicerol
<b>DHFR-TS</b>	Dihidrofolato reductasa transialidasa
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>EDTA</b>	Ácido etilen diamino tetracético
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>GPI</b>	Glicofosfatidil inositol
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b>HAc</b>	Ácido acético
<b>IFA</b>	Adyuvante incompleto de Freund
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton



<b>LGPs</b>	Glicoproteínas lisosomales
<b>mdi</b>	Multiplicidad de infección
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensajero
<b>NBT</b>	Azul de nitrotetrazolio
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>ORF</b>	Pauta abierta de lectura
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFPs</b>	Proteínas formadoras de poros
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A2
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
<b>PNP</b>	Para-nitrofenil fosfato
<b>pPy</b>	polipirimidina
<b>PTU</b>	Unidad de transcripción policistrónica
<b>PTK</b>	Fosfotirosin kinasa
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SBFi</b>	Suero bovino fetal inactivado
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SL</b>	<i>splice leader</i>
<b>Tris</b>	Trihidroximetil amino metano
<b>TDR</b>	<i>Tropical Diseases Research</i>
<b>UTR</b>	Región no traducida

Algunos términos que aparecen en este trabajo no han sido traducidos debido a que no se encontró una interpretación adecuada de los mismos. En el texto aparecen en cursiva y entre comillas.



# Resumen



## I RESUMEN

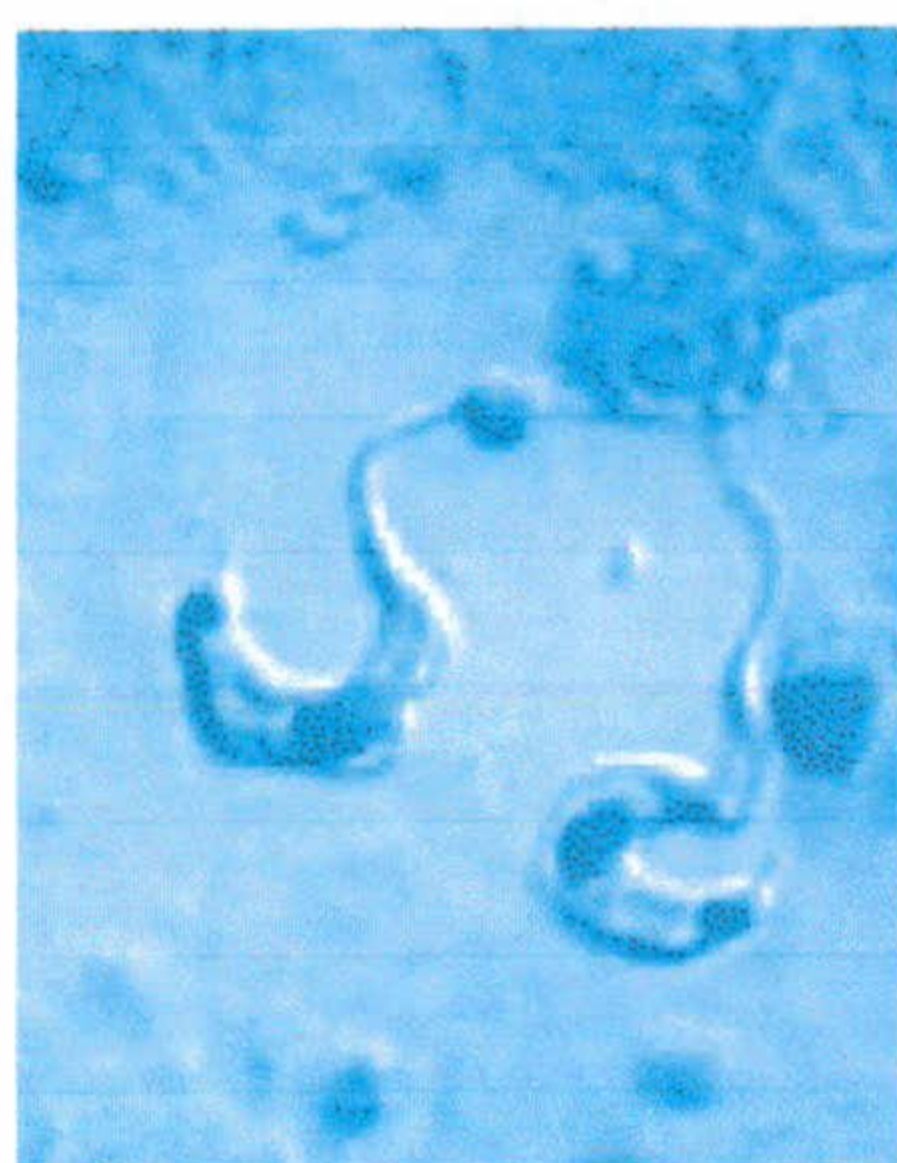
Las enfermedades causadas por parásitos eucarióticos representan uno de los mayores retos de la ciencia médica actual. Los parásitos de alta complejidad, y considerando sólo a los unicelulares, causan enfermedades que afectan a cientos de millones de individuos, y producen millones de muertes cada año [TDR, 1991-1992]. A esto último, que es suficientemente significativo, hay que añadir las consecuencias que estas enfermedades tienen para la vida económica y la producción alimenticia de los países en las que son endémicas. Los géneros *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Plasmodium* son, entre los protozoos parásitos, aquellos cuyo impacto sobre la calidad de vida es más notorio, tanto por la mortandad que causan como por la morbilidad de las enfermedades de las que son responsables, que en muchos casos, y cuando alcanzan la fase crónica, acarrearán deformación y/o discapacidad en los individuos afectados. A pesar de su impacto sanitario, hoy en día el conjunto de conocimientos que se poseen acerca del tratamiento o prevención de estas enfermedades es mínimo. Teniendo en cuenta la complejidad de los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a las relaciones parásito-huésped, se ha convertido en algo vital llegar a una mayor comprensión de los mismos para hacer frente a las enfermedades que provocan.

La invasión de las células hospedadoras por *Trypanosoma cruzi* es un proceso complejo que implica bastantes acontecimientos comenzando por el contacto del parásito con la célula. Inmediatamente después del contacto pero probablemente previo a la internalización del parásito, se produce el reclutamiento de los lisosomas celulares hacia el sitio de ataque y contacto con el parásito, donde se fusionarán temporalmente con la membrana plasmática. En una serie de rápidos acontecimientos el parásito es internalizado a través de la vacuola parasitófora formada por la fusión de los lisosomas con la membrana plasmática. Para completar su ciclo de vida, los parásitos deben escapar de esa vacuola, para lo que se propone la intervención de proteínas que parecen ser funcionalmente parecidas a la porina del complemento. Estas proteínas producirán poros en la membrana de la vacuola, quedando los parásitos libres en el citosol, donde terminarán de transformarse a amastigotes y se multiplicarán libremente, para poder continuar el proceso invasivo y culminar con éxito su ciclo de vida. Aunque la maquinaria celular implicada en el proceso es conocida, pocas moléculas del parásito han sido identificadas. De hecho, hasta la fecha solo tres proteínas



parasitarias, TcTOX, oligopeptidasa B, y TcMIP, se han mostrado de forma convincente en el proceso de invasión. Una nueva molécula implicada en el ciclo de vida de *T. cruzi* se identificó en un trabajo anterior en nuestro laboratorio. El gen *LYT1* fue clonado a partir de una librería de expresión de amastigotes en base a la reactividad cruzada con anticuerpos específicos para el componente C9 de la cascada del complemento. Sin embargo, usando análisis de homologías no se obtuvo ningún resultado. Basándose en el hecho de que TcTOX y *LYT1* son similares en tamaño y presentan reacción cruzada con anticuerpos dirigidos frente a C9, se pensó en una posible relación funcional entre estas proteínas, conociendo que TcTOX tiene actividad formadora de poros a pH ácido y que se postula que intervenga en el escape del parásito de la vacuola parasitófora al citosol. Utilizando mutantes nulos para el gen *LYT1* se realizaron ensayos de infección y hemolíticos que han mostrado que la deficiencia en *LYT1* produce una disminución significativa en la actividad lítica del parásito y, posiblemente debido a esto, en su infectividad. Además existen alteraciones en el proceso de cambio de estadio estando éste acelerado en el caso de los parásitos deficientes en *LYT1*. Tomando como base estos resultados se piensa que el producto del gen *LYT1* podría estar implicado en el proceso lítico e infectivo del parásito. La comprensión de este proceso, así como de las estrategias desarrolladas por el parásito para conseguir con éxito mantener su ciclo de vida en el hospedador, son de gran importancia a la hora de intentar combatir la enfermedad.





# Introducción



## II INTRODUCCIÓN

### II.1 TAXONOMIA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

#### II.1.1 Orden Kinetoplastidae.

El grupo de protozoarios flagelados pertenecientes al orden Kinetoplastidae son algunos de los organismos eucariotas más peculiares, y junto con los euglenoides, representan el linaje más antiguo de eucariotas con mitocondrias [Sogin y col., 1986]. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y, aunque algunas de las especies son de vida libre, la mayoría son parásitos de vertebrados, invertebrados y plantas.

La denominación del orden se debe a una estructura, única en su género, denominada kinetoplasto [Simpson, 1973; Chen y col., 1995], que está formada por el DNA de su única mitocondria. El orden comprende dos subórdenes: *Bodonina* (biflagelados de vida libre), que se separaron tempranamente del resto de las familias de este orden y *Trypanosomatina* (formas parasitarias). El suborden *Trypanosomatina* incluye una sola familia, la familia *Trypanosomatidae*. Los tripanosomas con hospedadores mamíferos se dividen en los grupos *Salivaria* y *Stercoraria* de acuerdo a que su modo de transmisión sea por inoculación (caso de *T. brucei*, que utiliza como vector el tipo de moscas tsé-tsé) o por contaminación con las heces (caso de *T. cruzi*, cuyo vehículo de transmisión son el grupo de los llamados insectos chupadores), respectivamente [Haag y col., 1998].

Desde un punto de vista evolutivo, los kinetoplástidos representan un estadio intermedio entre los eucariotas y los procariotas, ya que, aunque presentan un núcleo bien definido, una mitocondria y cromosomas empaquetados con histonas análogas a las de los eucariotas más desarrollados, también poseen características bioquímicas peculiares que no presentan los organismos eucariotas y sí las eubacterias, como son la carencia de intrones y la transcripción policistrónica.

Dentro de los kinetoplástidos, existen dos tipos de relaciones parásito-huésped: kinetoplástidos monogénicos con un único hospedador (invertebrado), y digénicos, con 2 hospedadores (uno invertebrado y otro vertebrado). Se cree que los géneros digénicos provienen de un ancestro monogénico, debido a la semejanza que muestran con las especies



monogénicas las etapas en el hospedador invertebrado de las especies digénicas patógenas [Deane y col., 1988].

### ORDEN KINETOPLASTIDAE (Phylum: Euglenozoa, Clase: Mastigophora)

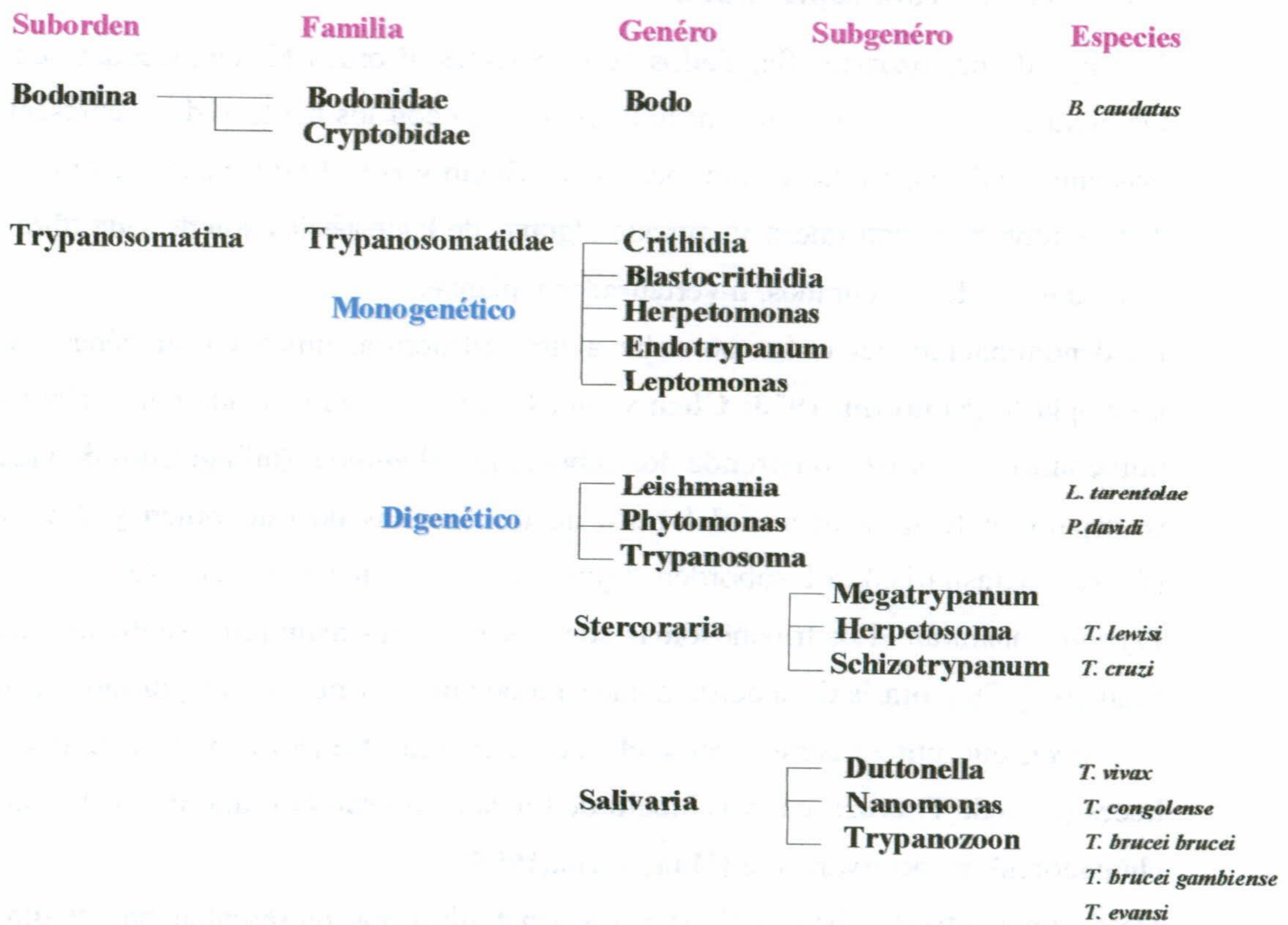


Figura II.1.-Organización taxonómica del Orden Kinetoplastidae

#### II.1.2 Familia Trypanosomatidae. Género *Trypanosoma*.

La familia *Trypanosomatidae* comprende los géneros *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Endotrypanum*, entre otros. Todos ellos poseen ciclos de vida digenéticos que alternan entre un hospedador invertebrado y un hospedador vertebrado, entre los que se han descrito más de 100 especies de mamíferos pertenecientes a diferentes órdenes. Son organismos protozoos

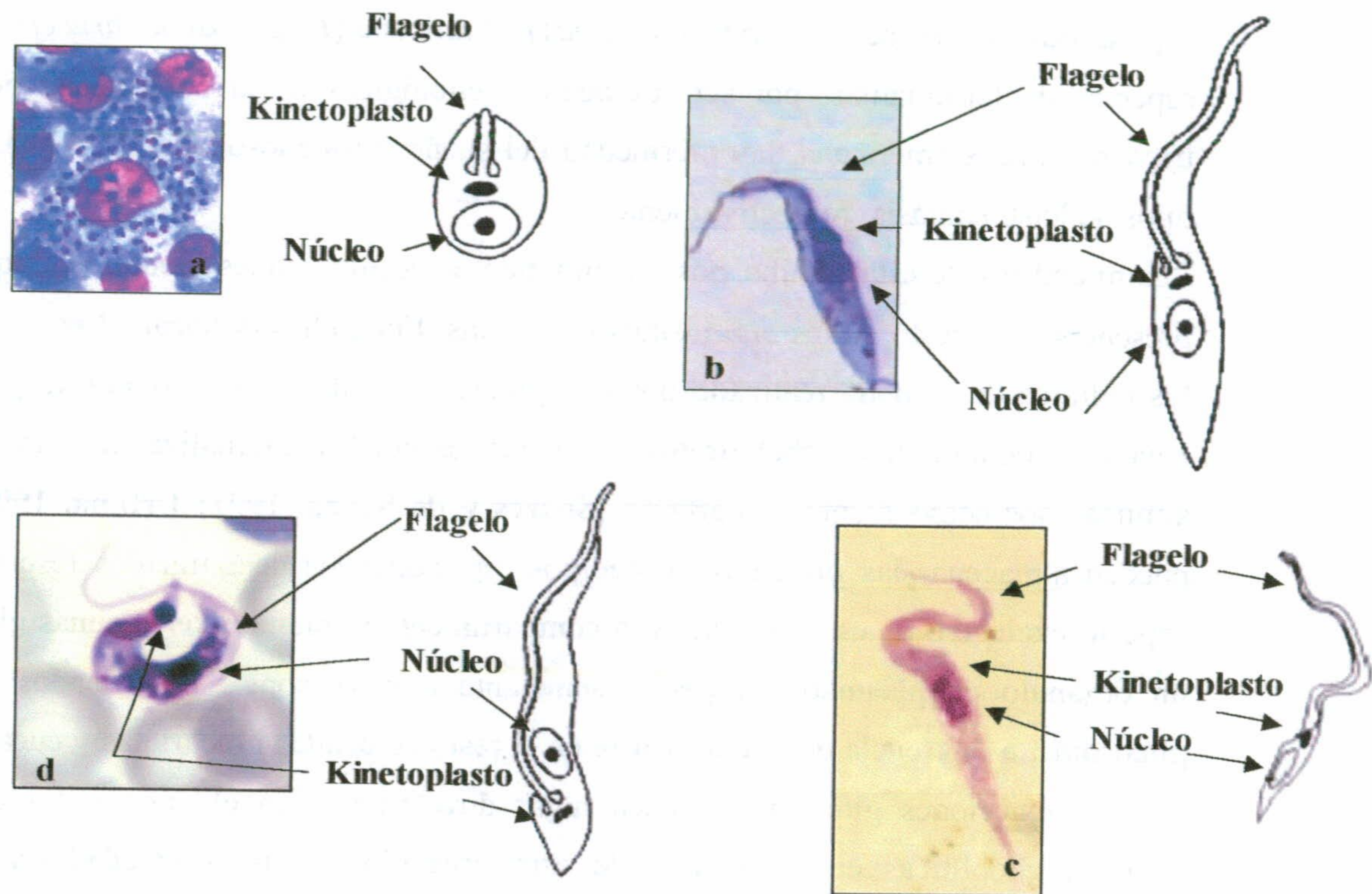


flagelados capaces de parasitar vertebrados, invertebrados, e incluso plantas (género *Phytomonas*). Los estudios realizados sobre esta familia se han centrado principalmente en el tripanosoma americano (*Trypanosoma cruzi*), el africano (*Trypanosoma brucei*), y diferentes especies de leishmanias, por ser los agentes etiológicos de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana, y distintos tipos de leishmaniasis, respectivamente.

Los miembros de esta familia poseen importantes peculiaridades bioquímicas que no están presentes en el resto de los organismos eucariotas. Entre ellas destacan el uso ineficiente de los hidratos de carbono realizado por los epimastigotes de *T. cruzi* [Cazzulo y col., 1985]. Una vez agotados los carbohidratos, los parásitos pueden internalizar proteínas y usar los aminoácidos como fuente de carbono [Soares y de Souza, 1991; Urbina, 1994]. Además pueden almacenar las proteínas en cuerpos especializados denominados reservomas. Otro aspecto exclusivo de esta familia es la compartimentalización de las enzimas glicolíticas en un orgánulo citoplasmático especial semejante a peroxisomas modificados denominado glicosoma, a diferencia de lo que ocurre en el resto de células procariotas y eucariotas en las que las reacciones glicolíticas tienen lugar directamente en el citosol. La presencia de enzimas glicolíticas en el interior de este orgánulo es una propiedad única de estos organismos, que se ha hallado en todos los representantes de la familia [Opperdoes., 1987].

### II.1.3 Características celulares o morfológicas.

En los tripanosomátidos se pueden distinguir cuatro estadios principales que se caracterizan por unas propiedades y morfología claramente diferentes. La forma **epimastigote**, flagelada es la forma replicativa en el insecto vector; la forma **metacíclica**, flagelada y no replicativa es la forma de transmisión de la infección desde el hospedador invertebrado al vertebrado; la forma **amastigote**, sin flagelo, es la forma replicativa en el hospedador mamífero; y la forma **tripomastigote**, con flagelo y no replicativa es la forma infectiva.



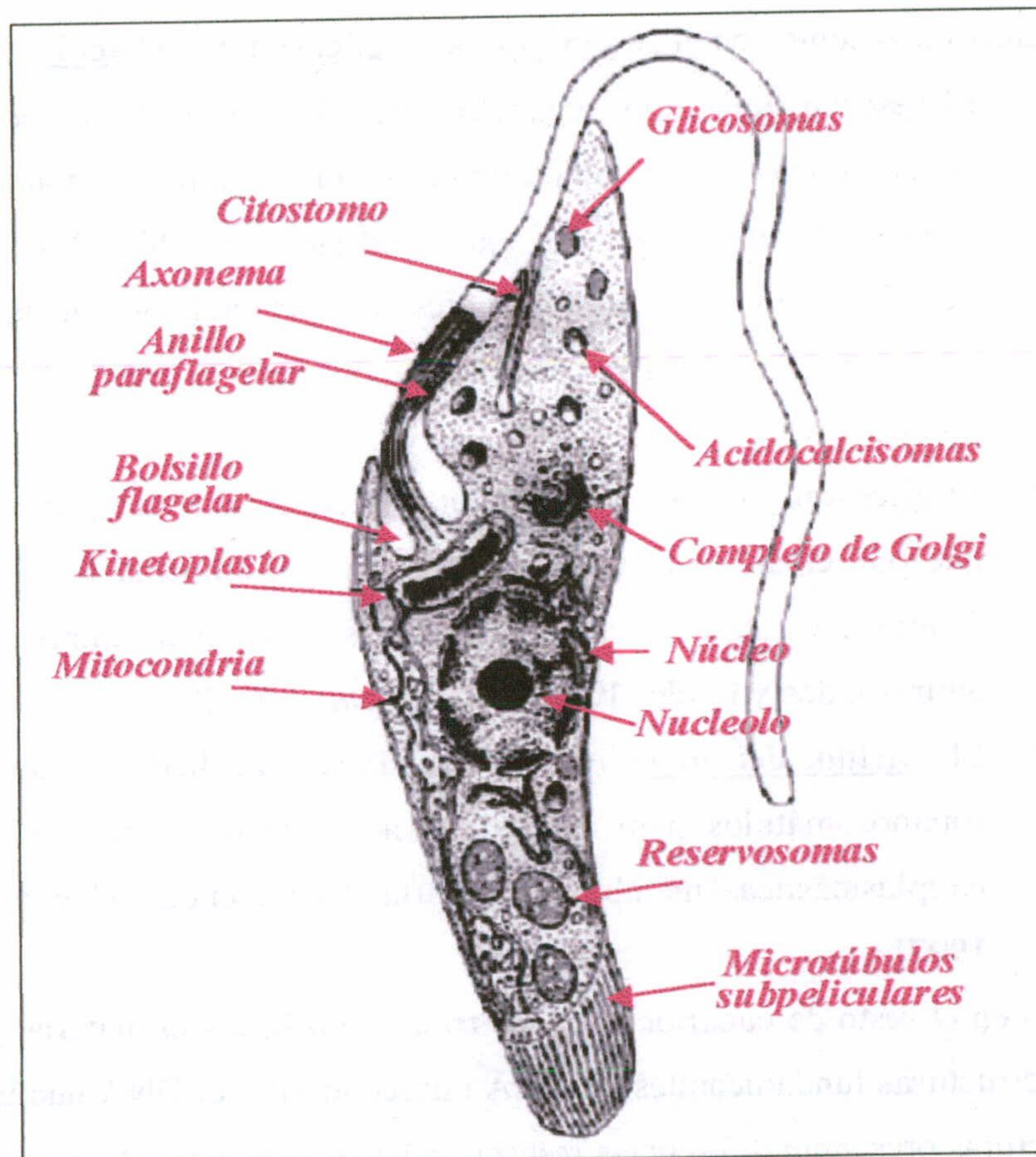
**Figura II.2.-Representación de los diferentes estadios de *T. cruzi*.** Se muestra en cada caso un esquema junto a la observación al microscopio de las muestras teñidas con Giemsa. Aparecen representados amastigotes (a), epimastigotes (b), metacíclicos (c), y tripomastigotes (d).

Desde el punto de vista morfológico, la superficie celular de los tripanosomátidos está compuesta de tres estructuras: el **glicocálix**, la **bicapa lipídica**, y la capa de **microtúbulos** subpeliculares.

- ✓ El **glicocálix** es una cubierta de glicoconjugados uniformemente distribuidos por el cuerpo celular y el flagelo, existiendo una concentración de sitios de unión a lectinas en la zona alrededor del citostomo [Pimenta y col., 1989].
- ✓ La **bicapa lipídica** origina zonas especializadas de la membrana plasmática como son el citostomo (presente sólo en las formas epi- y amastigotas), el bolsillo flagelar, y una zona implicada en la unión del flagelo al cuerpo celular. Aunque la membrana flagelar presenta una densidad de partículas mucho menor que la membrana que rodea el cuerpo celular, existe cierta concentración en la zona de unión entre el flagelo y el cuerpo celular.



- ✓ El **citostomo**, junto con la región del bolsillo flagelar, parece estar implicado en la ingestión de macromoléculas por las formas epimastigotas. Se origina en la parte anterior de la célula y se proyecta hacia la parte posterior alcanzando el núcleo. En esta estructura se pueden originar pequeñas vesículas endocíticas que llegan a fusionarse con el **reservosoma** [Soares y col., 1992].



**Figura II.3.-Esquema que representa la ultraestructura de *T. cruzi*.** Están representados los diferentes orgánulos y estructuras que forman parte en este organismo, estableciéndose las semejanzas y diferencias respecto a una célula eucariota normal., que se comentan en el texto.



- ✓ El citoesqueleto está formado por una capa de microtúbulos localizados por debajo de la membrana plasmática, que están conectados entre sí, con la membrana plasmática, y con el retículo endoplasmático, a través de estructuras proteicas. Esta red de estructuras altamente organizada interviene además en la diferenciación celular, migración tisular y motilidad.

En cuanto a los organelos citoplasmáticos, los tripanosomátidos poseen ciertos elementos característicos como son el **reservosoma**, el **glicosoma**, y el **acidocalcisoma**.

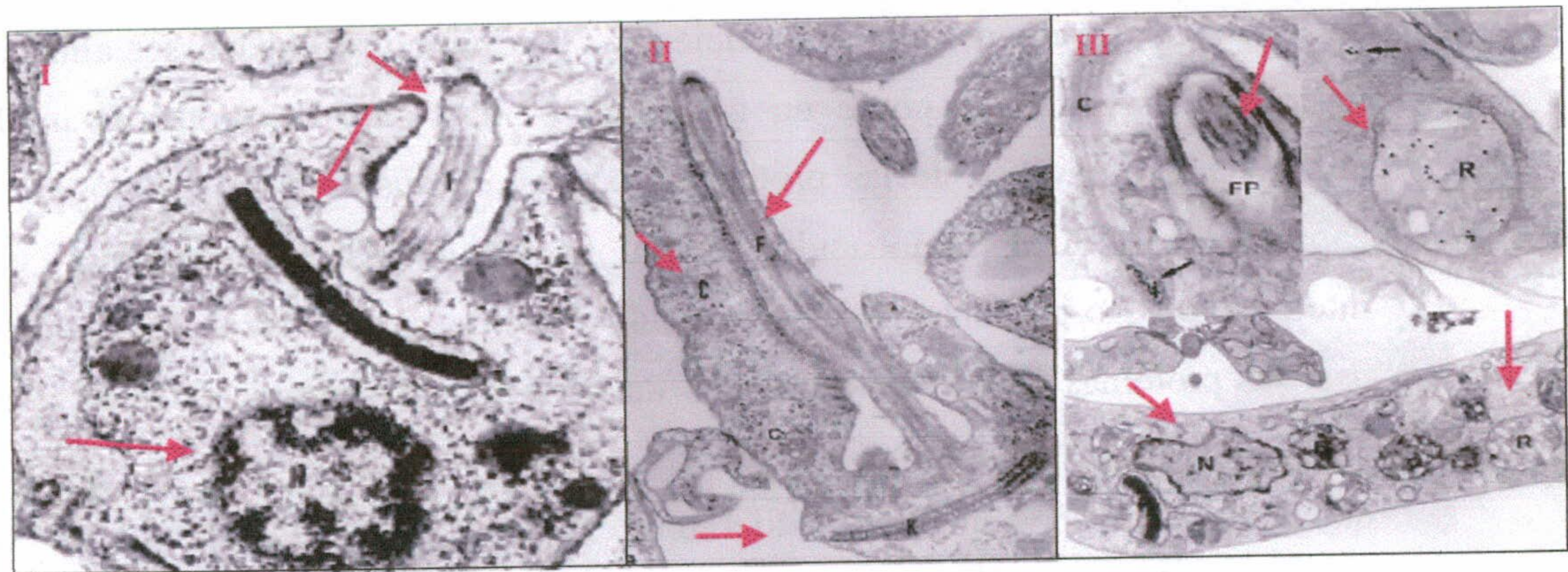
- ✓ El **reservosoma** es un organelo especializado localizado en la región posterior, que actúa como un compartimento prelisosomal, donde se almacenan las macromoléculas ingeridas que podrían ser utilizadas durante el proceso de transformación de epimastigotes a metacíclicos (metaciclogénesis). Contiene cruzipaina, la principal cisteína proteinasa de *T. cruzi*, que parece implicada en este proceso.
- ✓ El **glicosoma** es donde se hallan concentradas y compartimentalizadas las enzimas que participan en la vía glicolítica, lo que aumenta la eficiencia de este proceso. Contiene catalasa en algunas especies, y enzimas implicadas en la oxidación de aminoácidos y lípidos [Opperdoes y col., 1991].
- ✓ El **acidocalcisoma** es un organelo ácido especial utilizado por los tripanosomátidos para acumular  $\text{Ca}^{2+}$  y fósforo. El número de estas estructuras citoplasmáticas membranosas varía dependiendo del ciclo celular [Scott y col., 1997].

Como en el resto de eucariotas, en los tripanosomátidos el material genético se organiza en dos estructuras fundamentales: el DNA mitocondrial y el DNA nuclear. Sin embargo, ambas estructuras presentan diferencias respecto a las que se encuentran en eucariotas.

- ✓ El **kinetoplasto** es la denominación que se da a la región de la mitocondria donde se halla una condensación de DNA extranuclear, estructurado en una red de maxicírculos (que corresponden al DNA mitocondrial) y minicírculos (que codifican pequeños RNAs que controlan la especificidad del proceso de edición de los RNAm formados desde los maxicírculos) [Hadjuk y col., 1996]. Constituye aproximadamente el 30% del DNA celular total. La morfología del kinetoplasto varía de acuerdo con el estadio de desarrollo: en epi- y amastigotes, aparece redondeado, con el DNA altamente condensado y cercano al núcleo; en

tripomastigotes, se localiza en el extremo posterior opuesto al núcleo presentando una forma alargada, y el DNA está organizado de forma más dispersa [Dvorak y col., 1982].

- ✓ El **núcleo** de *T. cruzi* y otros tripanosomátidos tiene una organización estructural semejante al resto de células eucariotas. En los epimastigotes es alargado y se localiza en la zona central de la célula. En las formas tripó y amastigotas es redondeado y se encuentra en un extremo. Está rodeado por la típica membrana nuclear con poros. Una característica especial en este grupo de organismos es que la membrana nuclear permanece intacta durante todo el proceso de división. Los cromosomas no se condensan durante dicho proceso.



**Figura II.4.-Secciones vistas al microscopio electrónico de transmisión que representan algunas de las estructuras de *T. cruzi*.** La figura I pertenece a una sección de la forma amastigota donde puede observarse un corto flagelo (F), el kinetoplasto (K), y el núcleo (N). Las figuras II y III corresponden a secciones de epimastigotes, donde se observan, además de las estructuras anteriores, el citostomo (C), el bolsillo flagelar (FP), y reservosomas (R).

- ✓ El **flagelo** de los tripanosomátidos está implicado en, al menos, dos importantes procesos biológicos: en el movimiento celular y en la unión a las células huésped. Está conectado al cuerpo basal y emerge de una invaginación especializada, el bolsillo flagelar. En el flagelo se encuentra el **cuerpo paraflagelar**, que está compuesto por una red de estructuras proteicas filamentosas asociadas a los dobletes 4 al 9 del axonema. [Farina y col., 1986].





#### II.1.4 Metabolismo de los tripanosomátidos.

La familia *Trypanosomatidae* en general, y *Trypanosoma cruzi* en particular, presentan unas peculiaridades bioquímicas que los diferencian del resto de los eucariotas y procariotas [Urbina, 1994].

Los epimastigotes de *T. cruzi*, crecen en un medio rico usando ineficientemente los hidrocarburos, que son oxidados a CO<sub>2</sub> y ácidos dicarboxílicos [Cazzulo y col., 1985]. El proceso tiene lugar en el glicosoma. Éste contiene, además de las enzimas implicadas en la glicólisis, otras que intervienen en el metabolismo lipídico, pirimidínico y purínico [Opperdoes, 1987]. Una vez que se agotan los carbohidratos, el crecimiento del parásito se basa en la utilización de proteínas, que son capaces de internalizar desde el exterior a través de diversos mecanismos de gran eficiencia. Las proteínas pueden ser almacenadas en los reservosomas. *T. cruzi* posee un grupo muy importante de proteasas implicadas en el almacenamiento y uso de las proteínas, ya que, en ausencia de hidratos de carbono, son capaces de utilizar aminoácidos como fuente de carbono, sin por ello acumular intermediarios o productos finales reducidos [Soares y de Souza., 1991]. La capacidad de usar las proteínas de este modo es uno de los aspectos fundamentales del metabolismo de estos parásitos, lo que probablemente esté relacionado con las diversas fuentes de nutrientes que tiene a su disposición en los diferentes entornos con los que entra en contacto a lo largo de su ciclo de vida: el tracto intestinal de un triatomíneo, el medio interno extracelular de un vertebrado, y el medio interno celular, desde una vacuola fagolisosómica hasta el citosol.

#### II.1.5 Características moleculares o genéticas.

En general, se estima que *T. cruzi* posee unos 12000 genes, con una densidad de 1 gen por cada 3.5-4 Kb, que están distribuidos en dos **genomas**, uno en el núcleo y otro en la mitocondria [Porcel y col., 2000]. Ambos genomas poseen una serie de características distintivas que los separan de los de los eucariotas, y a las que, probablemente, se deba el éxito evolutivo de la familia.

La **organización del genoma** de los trypanosomátidos es diferente a la del resto de los eucariotas en los siguientes aspectos:



- ✓ Análisis de cinéticas de renaturalización han demostrado que los genomas de los trypanosomátidos son relativamente pequeños y que contienen secuencias altamente repetitivas, medianamente repetitivas y de copia única.
- ✓ *Leishmania donovani* [Leon y col., 1978] y *T. brucei* [Borst y col., 1980] poseen alrededor de 60-65% de los genes de copia única, mientras que *T. cruzi* posee mayor porcentaje de secuencias repetidas y tan solo un 30% de los genes son de copia única [Lanar y col., 1991].
- ✓ Entre los genes repetidos en tandem se hallan los genes de los RNA ribosómicos [Castro y col., 1981], del miniexón [De Lange y col., 1984] y la proteína 1f8 [González y col., 1985]. En general, la repetición en tandem de bajo número de copias parece ser una característica general para genes que codifican proteínas estructurales y proteínas implicadas en procesos celulares rutinarios (genes "housekeeping").
- ✓ Entre los genes de copia única que han sido descritos en *T. cruzi* se encuentran el gen del KAP [González y col., 1990], el de la glicoproteína gp72 [Cooper y col., 1991], el de la topoisomerasa II [Fragoso y Goldenberg, 1992], el de la DHFR-TS [Reche y col., 1994] y MIP [Moro y col., 1995].
- ✓ En tripanosomátidos los genes de copia única aparecen con relativa baja frecuencia, mientras que los genes formando series con orientación cabeza-cola (repeticiones en tandém), representan aproximadamente la mitad de los genes estudiados hasta la fecha. Una posible explicación a la elevada proporción de genes multicopia podría ser que se trate de un sistema que pretende evitar la pérdida de genes esenciales, ya que estos organismos presentan gran propensión a la translocación y amplificación de sus secuencias génicas. También podría interpretarse como un sistema de determinación de niveles específicos de RNA mensajero dada la ausencia general de regulación transcripcional en la expresión génica de los tripanosomátidos.

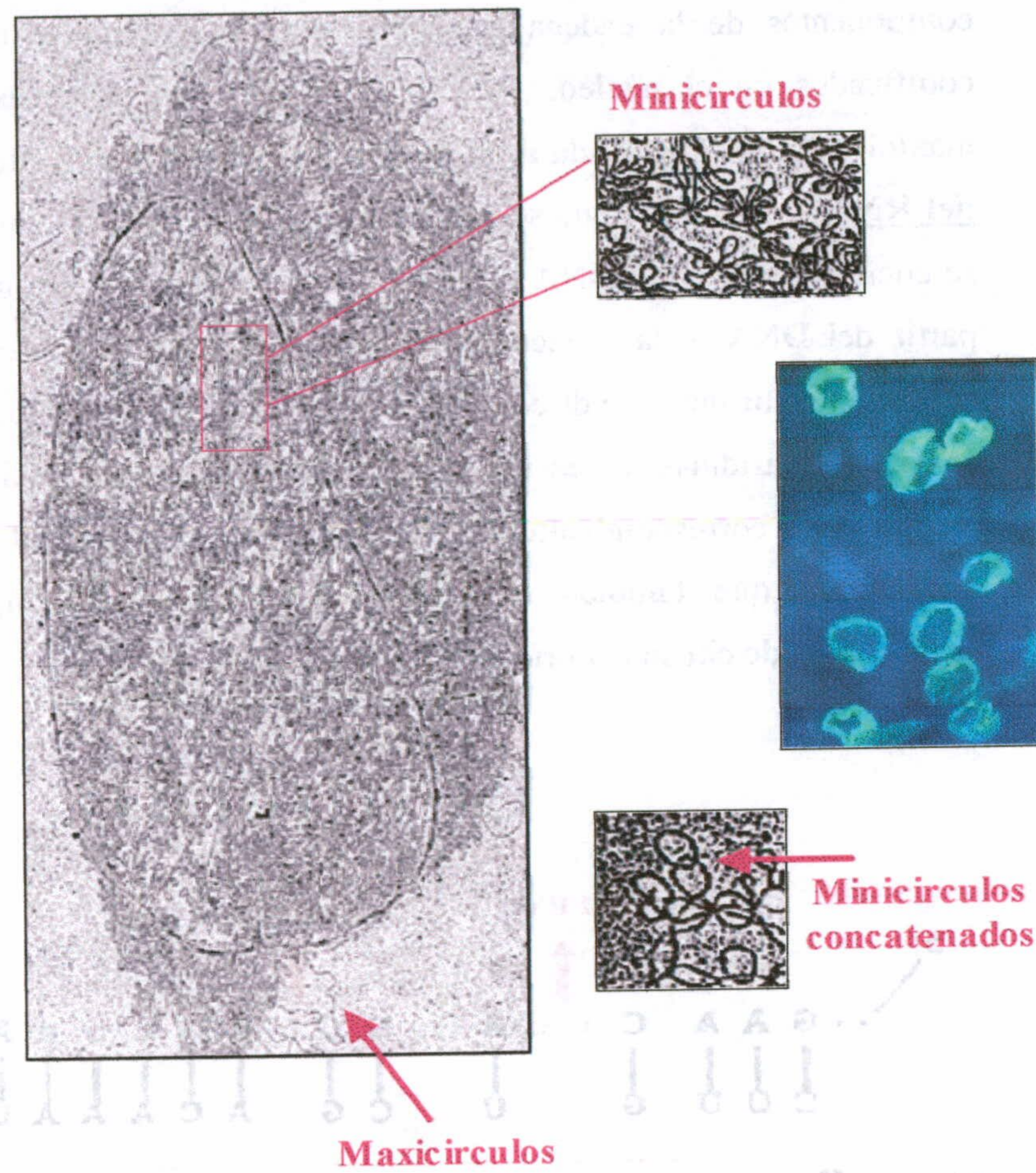
A pesar de que existe una gran controversia acerca de la **ploidía** de estos parásitos, en general se acepta que son organismos diploides para un número importante de marcadores génicos. Los genomas de los tripanosomátidos son relativamente pequeños. Poseen  $5 \times 10^7$  pares de bases por genoma haploide, lo que los sitúa por encima de los procariotas y próximos a las levaduras, y aproximadamente unos 250 cromosomas, uno de los números



más altos entre las especies conocidas, que no se condensan visiblemente durante la mitosis, permaneciendo la membrana nuclear intacta en todo el proceso [Gibson y Miles, 1986].

Los cromosomas se han clasificado en función de su **tamaño**, distinguiéndose los siguientes tipos de cromosomas: cromosomas con tamaños comprendidos entre 700 y 4000 Kpb (representan el 60% del DNA nuclear); cromosomas con tamaños que oscilan entre 150 y 500 Kpb; y por último, aquellos con tamaños comprendidos entre 50 y 100 Kpb (minicromosomas). Estos últimos no están presentes en todas las especies pero han sido detectados en *T. brucei*, *T. gambiense*, *T. congolense*, y *T. equiperdum* [Van der Ploeg y col., 1984]. Es común que exista gran variabilidad de tamaño entre los cromosomas que contienen marcadores génicos identificados, debido a la enorme plasticidad de su genoma. Así, mediante estudios de localización cromosómica de algunos genes "housekeeping", se ha observado que genes homólogos pueden tener diferente tamaño. Se ha sugerido que la gran variabilidad de los cromosomas de los trypanosomátidos podría estar relacionada no sólo con los mecanismos implicados en el establecimiento del parasitismo, sino también con su gran potencial adaptativo y evolutivo [Lanzer y col., 1995].

Respecto al **DNA mitocondrial o kinetoplasto**, el poseer una única mitocondria que contiene el DNA agrupado formando una red de compleja topología denominada kinetoplasto, situada en la base del flagelo, es la característica que mejor define a los miembros del orden Kinetoplastidae. El DNA del kinetoplasto está organizado en una compleja red que contiene dos tipos de moléculas circulares concatenadas. La red consiste en 5000 a 10000 minicírculos que varían en tamaño desde 0.5 Kpb (*T. vivax*) a 2.5 Kpb (*Crithidia fasciculata*), y unas 50 copias de maxicírculos cuyos tamaños oscilan entre 20 Kpb (*T. brucei*) y 40 Kpb (*C. fasciculata*). En concreto, en *T. cruzi*, el tamaño de los maxicírculos es de 39 Kpb y el de los minicírculos de 1.4 Kpb [Hajduk y col., 1992].



**Figura II.5.-Estructura del DNA del kinetoplasto de *Leishmania tarentolae*.** Contiene 10.000 minicirculos encadenados, que codifican los RNA guías, y 50 maxicirculos, que codifican genes, criptogenes y RNA ribosómicos. También se muestra el marcaje con DAPI de esta estructura.



- ✓ Los **maxicírculos** de todos los trypanosomátidos contienen genes que, generalmente, se encuentran en los genomas mitocondriales de otros organismos como los genes que codifican los RNAs ribosomales, algunos enzimas mitocondriales, y algunos componentes de la cadena transportadora de electrones, que normalmente son codificados en el núcleo. La expresión de estas proteínas codificadas por los maxicirculos está asociada a un mecanismo de procesamiento denominado **edición del RNA**, mediante el que se originan mRNA con nuevas pautas de lectura, que no se encuentran ni en el DNA ni en el transcrito primario: los genes son transcritos a partir del DNA, y la secuencia del pre-mRNA es modificada por la adición y/o delección de uridinas en dirección 3'-5' [Stuart, 1991]. Por lo tanto, la presencia y/o ausencia de uridinas representa la diferencia entre la secuencia del RNA mensajero maduro y la correspondiente secuencia del gen mitocondrial. Recientemente se ha demostrado que también existen modificaciones que implican la sustitución nucleotídica de citosina a uridina [Simpson y col., 2000]

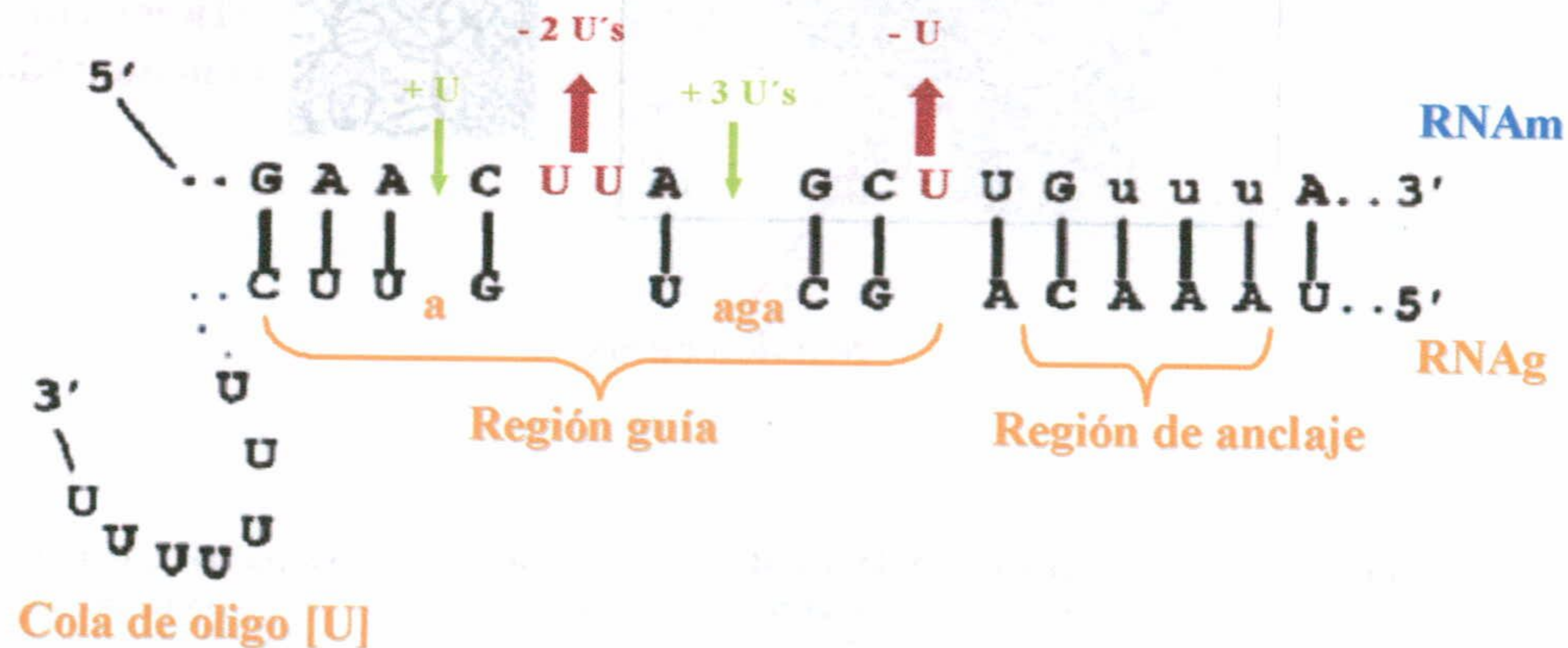
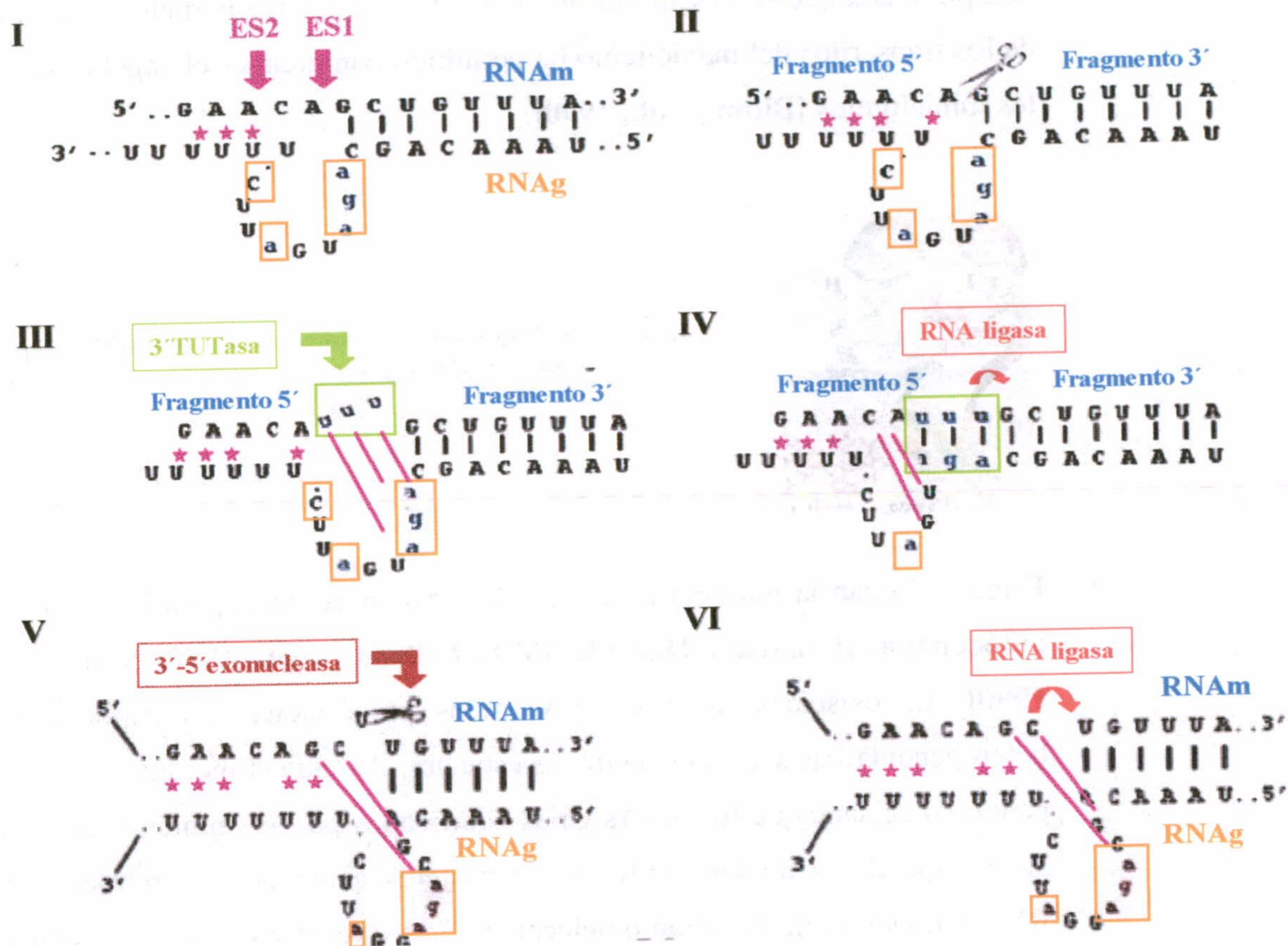


Figura II.6.-Esquema general del proceso de edición. Cada molécula de RNA guía posee tres elementos característicos que son una región de anclaje a la secuencia del RNA mensajero que se va a editar, una región guía, donde se produce la inserción o delección de uridinas, y una cola de oligo uridinas.



**Figura II.7.-Modelo de cascada enzimática para la edición del RNA [Blum y col., 1990].** La inserción de uridinas se propone que ocurre en 4 pasos principales: (I), hibridación del RNA guía con el RNAm corriente abajo del primer sitio de edición (ES1); (II), corte del RNAm en el sitio desapareado por una endonucleasa; (III), adición de uridinas al extremo 3' del fragmento 5' guiado por el apareamiento del RNA guía con el RNAm; (IV), ligación de los dos fragmentos por la RNA ligasa. La delección de uridinas podría ocurrir (V), eliminación de uridinas a través de la actividad 3'-5'-exonucleasa; (VI), unión de los fragmentos por la RNA ligasa. A continuación la edición se moverá al siguiente sitio (ES2).



- ✓ Respecto a la función de los **minicírculos**, ésta ha sido un misterio durante mucho tiempo, hasta que se descubrieron los RNAs guías, cuya participación en la edición de los transcritos del maxicírculo ha permitido comprender el papel desarrollado por los minicírculos [Blum y col., 1990].

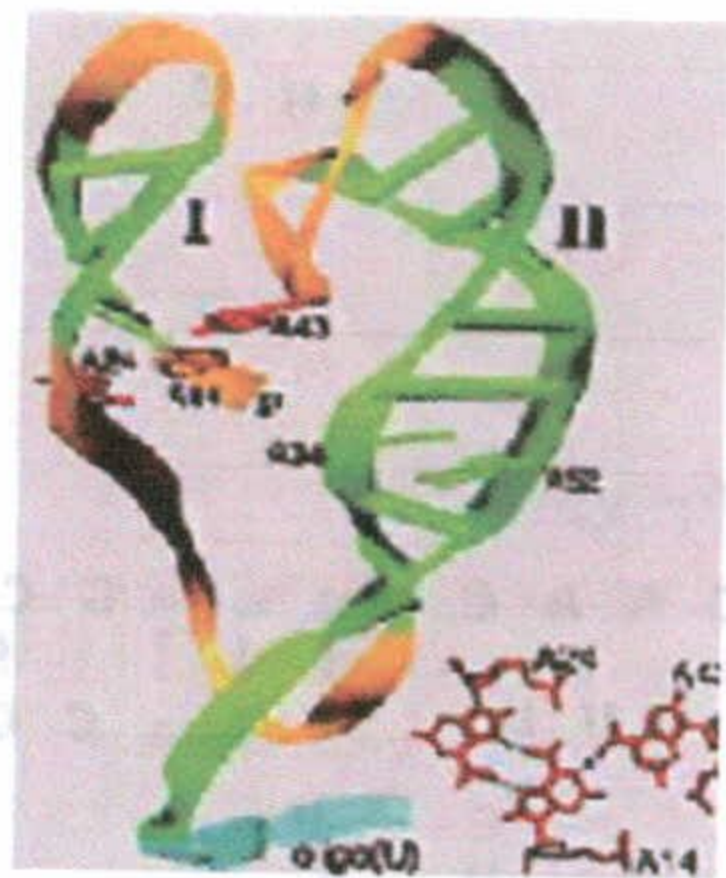


Figura II.8.-Estructura tridimensional predicha para la molécula de RNA guía

- ✓ Éstos codifican la mayoría de los RNAs guías necesarios para la edición del RNA mitocondrial [Pollard y Hadjuk, 1991; Pollard y col., 1990; Sturn y Simpson, 1990]. La existencia de los RNAs guías proporciona una explicación para la heterogeneidad de secuencia entre las especies. Aunque el mecanismo no es del todo conocido se sabe que los RNAs guías codificados por los minicírculos se acoplan a sitios específicos de los pre-RNAs mensajeros generando un híbrido pre-mRNA-RNAg, donde se adicionarán o deleccionarán los residuos de uracilo [Hadjik y col., 1993; Hermann y col., 1997]. Los RNAs guías determinan el número preciso y localización de las uridinas que van a ser insertadas o deleccionadas. El proceso de edición parece ocurrir en complejos ribonucleoproteicos que contienen RNAs guías, RNAs mensajeros y proteínas. El mecanismo de corrección de los mRNAs mitocondriales podría representar una manera de regular la expresión de los genes que se han de transcribir constitutivamente. Por ejemplo, en *T. brucei*, las formas sanguíneas carecen del ciclo del ácido cítrico y no se han detectado citocromos, mientras que sí están presentes en las formas procíclicas. Sin embargo, los genes mitocondriales se transcriben constitutivamente en los dos estadios. La diferencia se halla en que en las formas procíclicas los mRNAs están corregidos y, por tanto, se traducen efectivamente. Se ha postulado que este proceso de corrección de mensajeros tendría la misma finalidad que el “*splicing*” diferencial en eucariotas: la obtención de distintas pautas de lectura a partir de un transcrito primario. Existirían



dos niveles de regulación: a nivel de la síntesis de los gRNAs y en el uso de los mismos [Stuart, 1991].

A la hora de llevar a cabo la **transcripción** de sus genes, los tripanosomátidos, de forma semejante al resto de los eucariotas, disponen de las siguientes enzimas: RNA polimerasa I (responsable de la transcripción de los genes que codifican para los RNA ribosómicos), RNA polimerasa II (encargada de la transcripción de los genes que codifican proteínas) y por último, RNA polimerasa III (transcribe los genes correspondientes a RNAs cortos nucleares (snRNA) y el RNA 5S ribosomal).

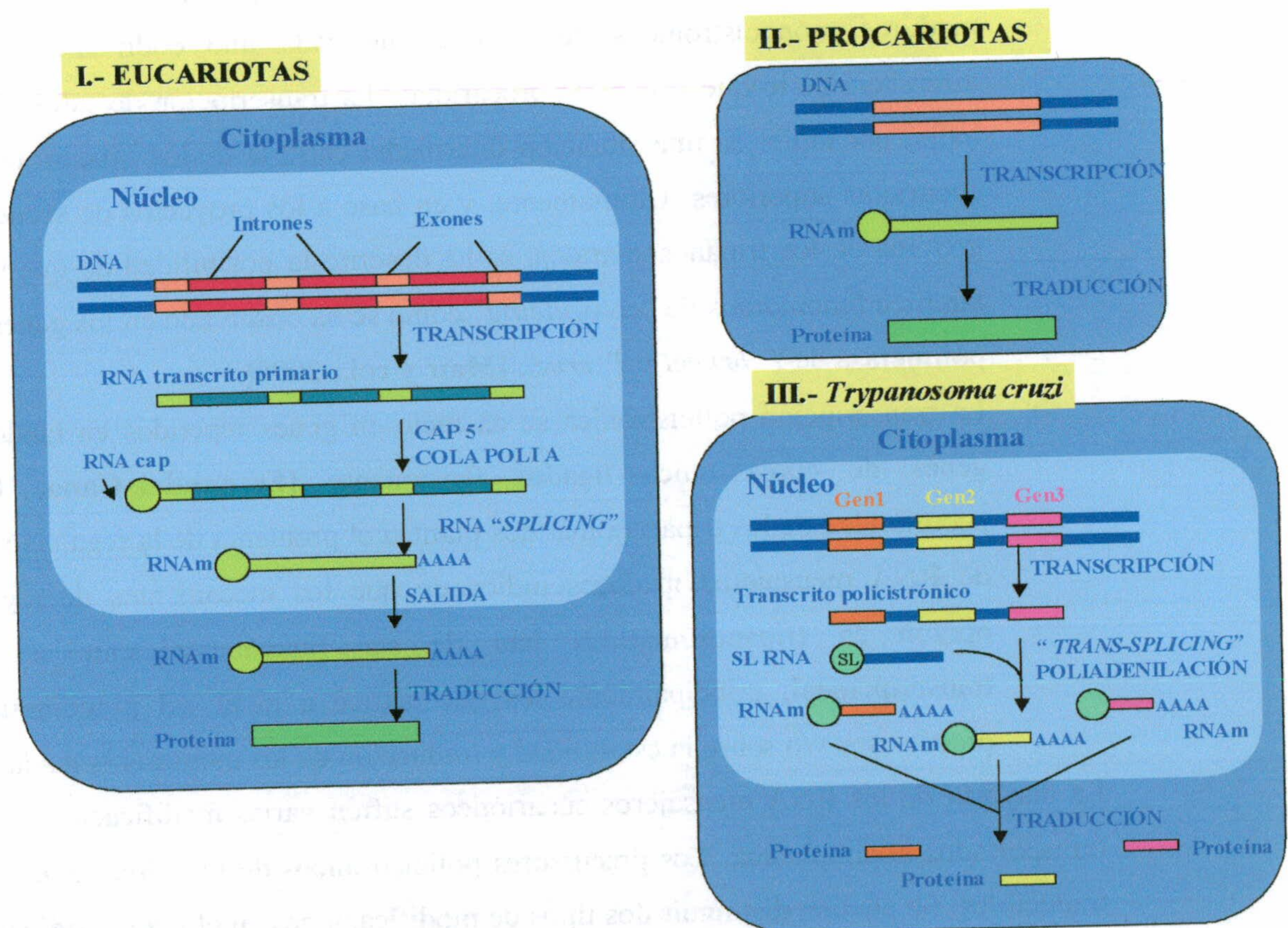


Figura II.9.-Comparación esquemática de los diferentes procesos que comprenden la transcripción génica y traducción proteica entre eucariotas (I), procariotas (II) y *T. cruzi* (III). El parásito muestra un comportamiento intermedio entre eucariotas y procariotas en los acontecimientos relacionados con la expresión génica, entre otros.





- ✓ Durante la transcripción ocurre uno de los hechos que diferencian a estos organismos: la RNA polimerasa recorre el DNA originando precursores que abarcan más de una pauta abierta de lectura, incluyendo también las regiones intergénicas [González y col., 1985; Muhich y Boothroyd, 1988]. De este modo se generan las unidades de transcripción policistrónica (PTU). Esta es una característica que recuerda a los procariotas, que también transcriben su material génico en largos precursores que abarcan varios genes, generalmente relacionados funcionalmente en operones, que pueden ser regulados transcripcionalmente según estímulos desencadenantes o represores de la transcripción del conjunto de genes. En los tripanosomátidos, los genes se procesan por “*trans-splicing*” para generar transcritos maduros monocistrónicos de manera que cada uno codificará un péptido, a diferencia de lo que ocurre en procariotas. La transcripción de estos organismos se halla, por tanto, en una situación intermedia entre la de los procariotas y la de los eucariotas superiores. Últimamente, y en base a los proyectos de secuenciación del genoma de los tripanosomátidos, se ha descrito la posibilidad de que se produzcan también fenómenos de “*cis-splicing*” como se ha observado en los genes de la polimerasa de *T. brucei* y *T. cruzi*. [Mair y col., 2000].
- ✓ La transcripción policistrónica se da tanto en genes repetidos en tandem como en genes de copia única ligados físicamente [Fernández-Cano, 1993]. Esta peculiaridad de los tripanosomátidos plantea el problema de la regulación diferencial de RNA mensajeros maduros indicando que los mecanismos de regulación que operan en tripanosomátidos han de ser fundamentalmente a nivel post-transcripcional, principalmente los que actúen a nivel del procesamiento de los precursores y/o sobre la estabilidad y traducción de los mensajeros maduros.

La mayoría de los RNA mensajeros eucarióticos sufren varias modificaciones antes de ser transportados al citoplasma. Los precursores policistrónicos de los tripanosomátidos no son traducibles. Se pueden distinguir dos tipos de modificaciones en el **procesamiento del RNA nuclear**: la adición de una secuencia en el extremo 5' del RNA mensajero nuclear (“*trans-splicing*”), y la adición de una cola de adeninas en el extremo 3'. Además los RNA mensajeros mitocondriales sufren el proceso de edición del RNA. La existencia de estas vías de procesamiento en tripanosomátidos tiene profundas consecuencias para la expresión y organización de su información genética.



✓ “*Trans-splicing*”:

- es el proceso mediante el que pre-RNAm policistrónico se convierte en RNAm monogénico [Hummel y col., 2000]. En los tripanosomas, los RNA mensajeros son generados a través de un proceso mediante el cual el RNA “*splice leader*” (SL) dona una secuencia de 39 nucleótidos denominada miniexón, al extremo 5' de cada exón codificante [Van der Ploeg, 1986]. Esta secuencia es imprescindible para que se inicie la traducción. De este modo se unen dos exones codificados en genes distintos e independientes, creándose un RNA quimérico que contiene en el extremo 5', el miniexón cedido por el SL-RNA, y en el extremo 3' la secuencia del exón codificante proveniente del pre-RNA mensajero policistrónico. El primer paso de la reacción es una ruptura en el sitio 5' del RNA SL y la formación simultánea de un intermediario en Y. Esta estructura se forma como consecuencia de la unión que ocurre entre el primer nucleótido del extremo 5' del SL, una guanosina, y una adenosina interna corriente arriba del sitio aceptor de “*splicing*” en 3' del pre RNAm. En un segundo paso, la estructura en Y desaparece al unirse la secuencia del SL al pre RNAm en el sitio aceptor en 3' [Hummel y col., 2000]. La secuencia del miniexón es común para todos los RNA mensajeros, característico de cada especie y corresponde a los primeros 39 nucleótidos de un transcrito de 140 nucleótidos codificado en una unidad de 1.4Kb (SL-RNA), que se halla presente en el genoma en un número aproximado de 200 copias [Walder y col., 1986]. La maquinaria que lleva a cabo la reacción de “*trans-splicing*” parece estar relacionada con la que lleva a cabo el “*cis-splicing*” en levaduras y eucariotas superiores. La diferencia radica en que el “*trans-splicing*” es una reacción intermolecular y el “*cis-splicing*” es intramolecular [Sather y Agabio, 1985]. Además el RNA precursor posee en su extremo 5' una estructura (5 metil guanosina) diferente a la descrita en eucariotas superiores y que se une mediante un enlace 5'-5' trifosfato a cuatro nucleótidos de secuencia variable. Existe una secuencia consenso para los dos últimos nucleótidos del exón, idéntica a la secuencia consenso para el “*cis-splicing*”, UG. El miniexón, por su parte, es añadido en una posición marcada mediante una secuencia consenso, el dinucleótido AG, presente en el RNA aceptor, siempre corriente arriba del ATG



iniciador y a una distancia variable de éste. La determinación del sitio aceptor de *splicing* viene dada por una cola de polipirimidinas situada preferentemente entre las posiciones -40 y -10 respecto a la posición en 3' del sitio aceptor [Huang y col., 1991; Matthews y col., 1994 ].

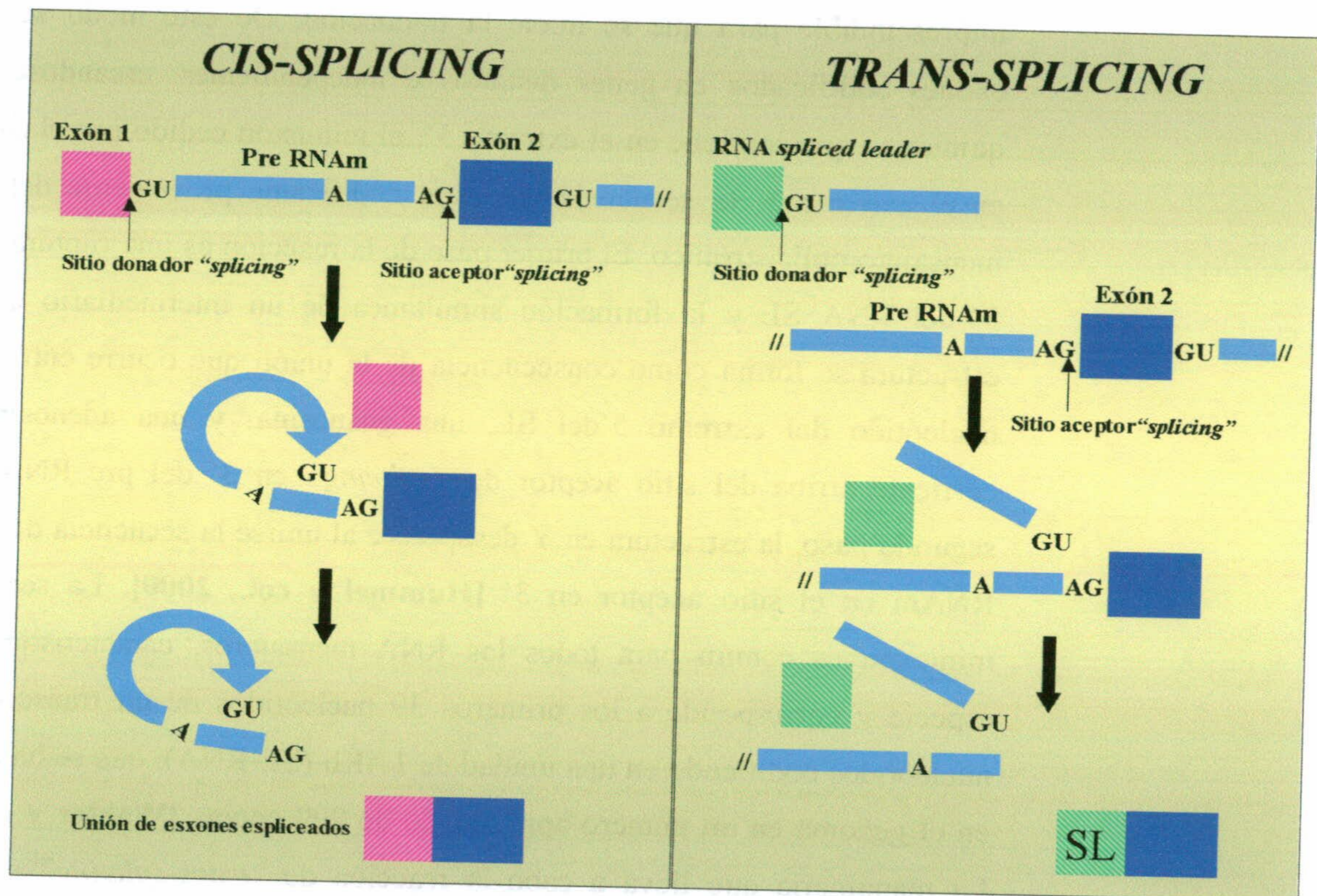


Figura II.10.-Comparación esquemática de los acontecimientos que conducen a los procesos génicos de "cis" o "trans-splicing".

- El procesamiento de algunos RNAs mediante "trans-splicing" ha sido también descrito en *Tetrahymena* [Robertson., 1986], en cloroplastos [Zaita y col., 1987; Koller y col., 1987], y en el nematodo *Caenorhabditis elegans* [Kause y Hirsh, 1987.; Sharp., 1987]. Según estos datos, se ha propuesto un origen ancestral común para ambos mecanismos, *trans* y *cis*, siendo más antiguo el "trans-splicing". Por otro lado, el hecho de que este proceso se halle altamente conservado sugiere su implicación en aspectos relacionados con el metabolismo



de los RNA mensajeros, tales como el transporte al citoplasma, traducción y estabilidad [Perry y Agabian, 1991].

- Significado del “*trans-splicing*”: La mayoría de los genes caracterizados en tripanosomátidos se encuentran repetidos en tandém. Los correspondientes transcritos son largos precursores policistrónicos que se procesan dando lugar a RNAs mensajeros discretos. El papel del “*trans-splicing*” puede ser el de proveer a estos mensajeros de una estructura (*cap*) que no podrían adquirir por carecer de los 5' trifosfato requeridos para ser sustrato de la guanil transferasa. En tripanosomátidos sólo los U-RNAs y el medRNA son sustrato de la GTasa y de las posteriores modificaciones que constituyen la estructura completa del *cap* [Zwierzynski y Buck, 1990]. Así, el *cap* es añadido post-transcripcionalmente a los RNA pre-mensajeros a través del “*trans-splicing*”, por la incorporación del mini-exón, el cual presenta dicha modificación en el extremo 5'. Otro aspecto interesante que implica el “*trans-splicing*” se refiere a las RNA polimerasas que intervienen en la transcripción de genes que codifican proteínas. En eucariotas estos genes son transcritos únicamente por la RNA polimerasa II. Pero en tripanosomátidos parece que ciertos genes podrían ser transcritos por la RNA polimerasa I. La incapacidad de esta enzima para producir RNA mensajeros maduros podría deberse a la ausencia de una actividad GTP-transferasa asociada a esta polimerasa que modifique los extremos 5' de los transcritos, haciéndolos traducibles. En tripanosomátidos, la adición del *cap* se produce post-transcripcionalmente a través del “*trans-splicing*”. De esta forma, la actividad de la RNA polimerasa I podría conducir a RNA mensajeros traducibles en estos organismos. El mecanismo de “*trans-splicing*” puede considerarse, desde el punto de vista biológico, de gran valor adaptativo para los tripanosomátidos, incrementando su plasticidad genética y el potencial codificado en sus genes [Gonzalez y col., 1985].

✓ *Poliadenilación:*

- los RNA mensajeros maduros del tripanosoma presentan en su extremo 3' no codificante una cola con un número variable de residuos de adenosín monofosfato, denominada poli(A). Esta cola es añadida al extremo 3' del



- transcrito mediante la acción del enzima poli(A) polimerasa que utiliza como sustrato ATP, y es necesaria para la generación de mensajeros maduros.
- Recientemente, en *Leishmania* se ha demostrado que este proceso está acoplado al “*trans-splicing*” y que la posición del aceptor de “*splicing*” es la que determina el sitio de poliadenilación del gen que se encuentra corriente arriba lo que hace suponer que la maquinaria que ejecuta ambos procesos sea la misma [LeBowitz y col., 1993; Vasella y col., 1994].
  - En los mensajeros eucarióticos la secuencia AAUAAA, que se encuentra entre –15 y –30 por encima del sitio de poliadenilación, ha demostrado ser esencial para la formación del extremo 3’ y su posterior poliadenilación [Wahle y Keller, 1992]. Esta secuencia no aparece en los mensajeros tripanosómicos. La ausencia de secuencias consenso responsables de la regulación del proceso de poliadenilación es otro de los caracteres que diferencia a esta familia de los eucariotas. Realmente esta secuencia no sería necesaria si el aceptor de “*trans-splicing*” del gen corriente abajo, determina el sitio de poliadenilación corriente arriba. Parece que la función de la poliadenilación está relacionada con la estabilidad de los transcritos, pero aún no se ha determinado claramente.

La **salida desde el núcleo del RNA mensajero** totalmente procesado es imprescindible para la expresión génica. Los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica sugieren que los RNAs son exportados a través de los poros de la membrana nuclear. Existen ciertas cuestiones en el mecanismo de salida de los RNA mensajeros del núcleo, tales como la retención diferencial en el núcleo de ciertos RNAs como son los intermediarios del “*splicing*”. Parece que existen auténticas señales bastante complejas que regulan la salida o no del núcleo al citoplasma. Entre ellas estaría la estructura del “cap”, y la formación de un extremo 3’ correcto.

Cuando se estudia la **regulación de la expresión génica** en tripanosomátidos, hay que tener en cuenta que su ciclo de vida implica cambios en el medio ambiente que rodea al parásito, como consecuencia de las diferentes condiciones fisiológicas de sus hospedadores. Estos cambios inducen procesos de diferenciación que representan modificaciones profundas tanto en la morfología como en el metabolismo del parásito. Por lo tanto, se puede decir que existe una regulación dependiente de estadio de las proteínas implicadas en los procesos de diferenciación y desarrollo de la infección. Estudios realizados por varios grupos muestran



una regulación a lo largo del ciclo infectivo de la expresión de proteínas presentes en la superficie del parásito, que median la interacción entre las células del hospedador y el parásito. Análisis de proteínas de choque térmico muestran una termorregulación de su expresión [Lee y Van der Ploeg, 1990; Shapira y Pedraza, 1990]. Otros ejemplos de expresión génica específica de estadio se han descrito para ciertas enzimas metabólicas [Bakalara y col., 1991; Parsons y col., 1989], así como para el gen de la  $\beta$ -tubulina [Bhaumik y col., 1991]. Sin embargo, la mayoría de los mecanismos responsables de la expresión diferencial de estos genes no se conocen, aunque se considera que los principales puntos de regulación en tripanosomátidos estarían en el nivel de los procesos de maduración, salida del núcleo del RNA mensajero y traducción. También se le está dando gran importancia al papel que parecen desempeñar las secuencias no traducidas del mRNA. Así por diferentes estudios realizados, el papel de las regiones 3' y 5' no traducidas del mRNA parece estar relacionada con el control de la estabilidad del mismo. Entre los estudios realizados están aquellos que han mostrado claras diferencias entre la expresión génica en tripanosomátidos y el proceso análogo en eucariotas. La expresión génica implica tres pasos fundamentales susceptibles de ser regulados: la transcripción, el procesamiento del transcrito primario y la traducción del RNA mensajero. Por lo tanto, los mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica en la célula eucariótica se agrupan en procesos de regulación pretranscripcional, posttranscripcional y traduccional.

- ✓ La regulación pretranscripcional incluye tanto la activación de la estructura de genes como aquellos elementos (inductores o represores) y secuencias génicas (promotores y potenciadores) responsables de la activación e inactivación del inicio de la transcripción. La ausencia de promotores permite descartar la posibilidad de una regulación a nivel de inicio de la transcripción, aunque existen dos casos de regulación a este nivel en tripanosomátidos. Se trata del *locus* VSG (glicoproteínas variables de superficie) de *T. brucei*, y del RNA ribosómico [Sogin y col., 1986]. Por otro lado, la expresión de genes involucrados en la replicación del DNA de tripanosomátidos, como es el caso de la histona H2B de *T. cruzi* [García-Salcedo y col., 1994], está sujeta a un control periódico siendo máximo durante la fase S del ciclo celular. Parece ser que estos controles operan al nivel de abundancia de RNAm. A su vez, el que dependan de elementos presentes en la secuencia del RNAm [Pasion y col., 1994], sugiere fuertemente que procesamientos post-



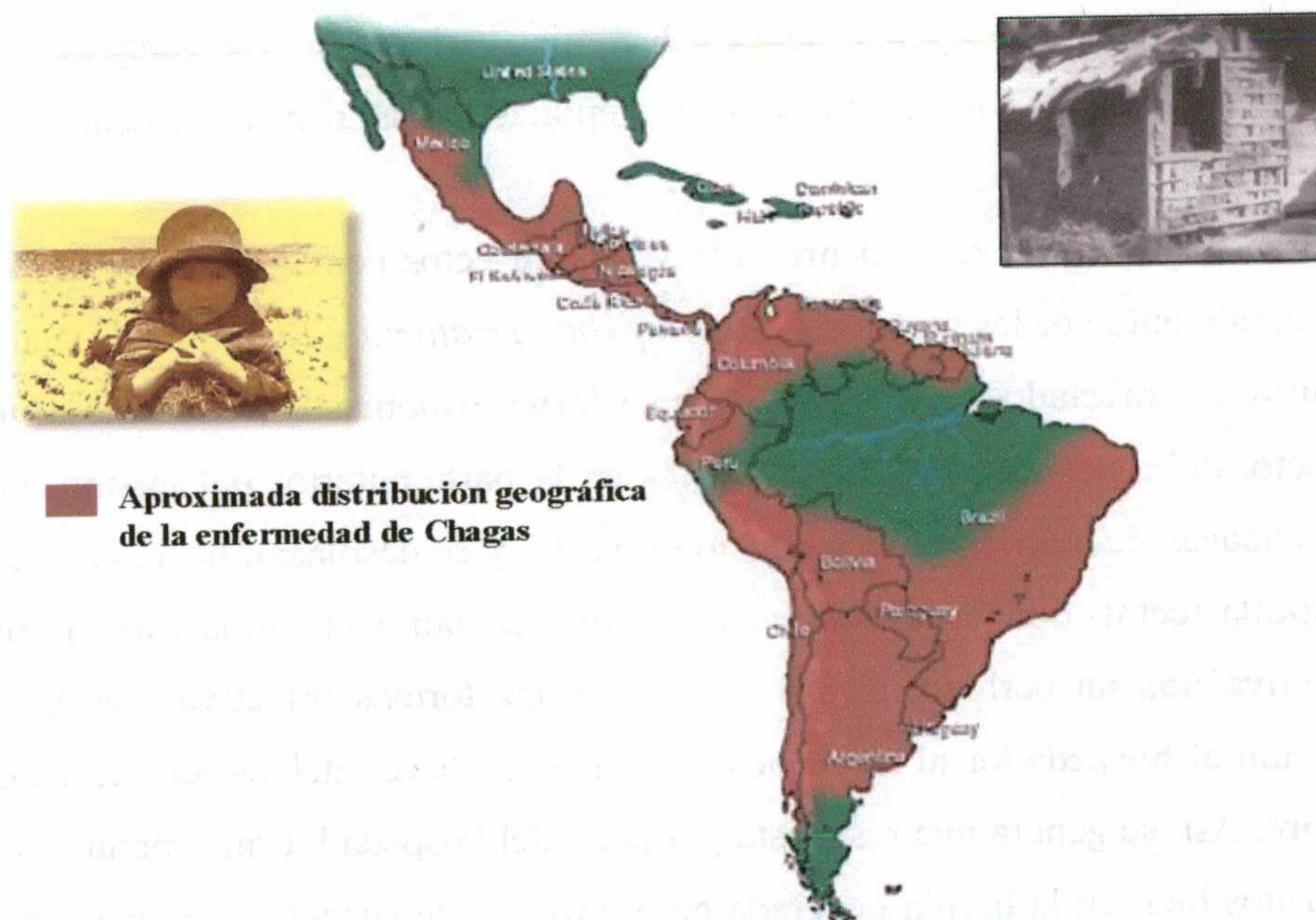
transcripcionales, tales como la maduración del RNA, están bajo el control del ciclo celular.

Los procesos responsables de la regulación postranscripcional actúan sobre la maduración de los RNAs primarios, el transporte de los mRNAs maduros al citoplasma, y su estabilidad en el mismo. Los estudios de regulación génica realizados en eucariotas señalan a la transcripción como el nivel principal de la regulación, siendo la decisión de transcribir o no un gen el primer y a veces el único paso de control de la expresión [Di Noia y col., 2000]. Sin embargo, y como se comentó anteriormente, los genes en tripanosomátidos se encuentran, generalmente, agrupados en el genoma y son cotranscritos en grupos generándose un precursor policistrónico que se coprocesa. Una consecuencia de este tipo de organización es que, la regulación no puede darse a nivel de la iniciación de la transcripción ya que cada gen corriente abajo sería transcrito equimolecularmente a los demás de su grupo de transcripción. Sin embargo, se ha observado que los niveles de expresión son diferentes tanto a nivel de mRNA como de los productos de traducción. Por otro lado, los RNA mensajeros individuales son generados por “*trans-splicing*” y poliadenilación, que podrían jugar un papel muy importante en la regulación. Existen evidencias de que el procesamiento ocurre co-transcripcionalmente en lo que sería, probablemente, uno de los determinantes de la velocidad de acumulación de RNA monocistrónico. De no ser así, no se explicarían los distintos niveles de RNAm y la diferente expresión observada en genes que no poseen ninguna relación funcional pero que son transcritos conjuntamente. Es el caso del *locus* de la aldolasa en *T. brucei* y el *locus* KAP en *T. cruzi* [Fernández-Cano, 1993]. Por otro lado se han descrito casos como el del gen *ADG1* de *Trypanosoma brucei* en el que se observa “*trans splicing*” dentro del mismo gen, lo que origina dos poblaciones de transcritos del mismo gen que difieren en la extensión de la región 5' no traducida [Revelard y col., 1993]. En el caso del gen *ESAG6* parece que el decidir entre uno u otro sitio aceptor de “*splicing*” está regulado según el estadio, lo que indica que este mecanismo de “*splicing*” alternativo podría jugar un papel en el control de la expresión génica diferencial durante el desarrollo del parásito. Lo mismo podría pensarse para la poliadenilación, desde el punto de vista de considerar ambos procesos acoplados [Revelard y col., 1993].



## II.2 TRYPANOSOMA CRUZI.

A comienzos de este siglo se identificó el entonces llamado *Schizotrypanum cruzi*, como el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. La clasificación taxonómica lo sitúa en el orden *Kinetoplastidae*, Suborden *Trypanosomatina*, y Familia *Trypanosomatidae*. El protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana que afecta a 18 millones de personas en América Latina, siendo esta enfermedad en muchos casos letal y actualmente incurable [O.M.S., 1991]. Representa, por tanto, uno de los mayores problemas de salud en el continente americano.



**Figura II.11.- Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.** La infección se localiza únicamente en América, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile. La Organización Mundial de la Salud estimó en 1991 que 16-18 millones de personas estaban infectadas en toda América, y que otras 100 millones de personas tenían el riesgo de contraer la enfermedad

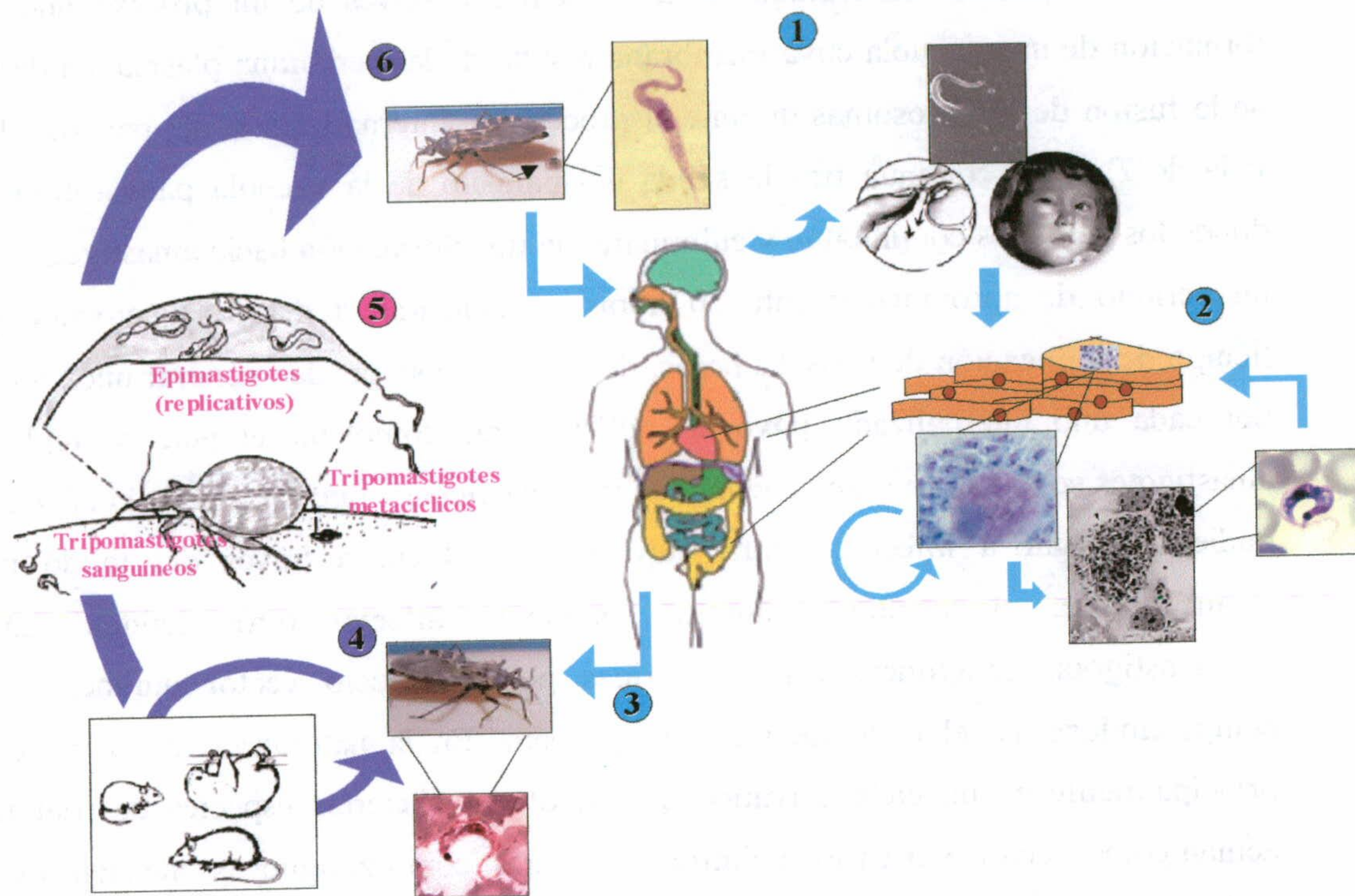




### II.2.1 Ciclo de vida.

En el ciclo de vida digenético de *T. cruzi* participan cuatro formas del parásito (formas **amastigotas, epimastigotas, tripomastigotas y metacíclicas**), relacionadas con ambientes diferentes, y claramente diferenciadas en morfología, capacidad de replicación y capacidad infectiva. Las formas replicativas son los epimastigotes (alargados y con flagelo), que se dividen en el lumen del intestino del insecto, y los amastigotes (redondeados y con un corto flagelo), que lo hacen en el citoplasma de la célula huésped, ambos por fisión binaria. Los tripomastigotes son formas alargadas, flageladas y no replicativas. Son las formas infectivas, y en función de su origen se pueden distinguir el tripomastigote sanguíneo y el metacíclico, provenientes de las formas amastigotas y epimastigotas, respectivamente, y en los ambientes adecuados.

La transmisión de *T. cruzi* ocurre a través de insectos hematófagos de la familia Reduviidae, principalmente por los géneros *Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. Cuando el vector pica a mamíferos infectados, los parásitos en su forma tripomastigote, pasan al tubo digestivo del insecto, diferenciándose a epimastigotes en la parte anterior del mismo. Los epimastigotes son capaces de multiplicarse por fisión binaria, y se desplazan hacia el intestino medio-bajo (ampolla rectal) donde eventualmente se diferencian a la forma tripomastigota metacíclica infectiva tras un periodo de 8 a 10 días. Estas formas infectivas, incapaces de dividirse, infectan al hospedador al ser depositadas por las heces del insecto durante la ingestión de sangre. Así, se genera una respuesta por parte del hospedador que conduce a la entrada de los parásitos bien en la herida generada en el proceso de succión, o activamente a través de las mucosas o puntos de discontinuidad en la piel [Brack, 1968; Brener, 1973]. Otras formas de adquirir la infección incluyen infecciones transplacentarias, y transfusiones sanguíneas. Esta última vía se ha convertido en la principal forma de adquirir la enfermedad en las ciudades, masificadas con personas procedentes del medio rural, próximas a zonas endémicas.



**Figura II.12.- Ciclo de vida del protozoo parásito *T. cruzi*.** 1, La infección del mamífero se inicia cuando un insecto infectado defeca mientras se alimenta, liberando tripanosomas metacíclicos en sus heces y orinas. Los tripanosomas, incapaces de atravesar la piel intacta, entran en el organismo a través de excoriaciones de la piel (sitio de la mordedura), o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células hospederas. 2, Dentro de las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean originando la forma amastigote, que se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotes casi llenan la célula, se transforman en tripomastigotes, los cuales son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, rompiendo la célula. Los tripomastigotes tienen la habilidad de invadir otras células, donde se transforman de nuevo en amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección. 3 y 4, Las chinches se infectan al picar a un animal infectado, ingiriendo así al parásito (en su estadio de tripomastigotes). 5, Dentro de la chinche y a lo largo de su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones antes de ser expulsado en las heces. En el estómago del insecto, los tripanosomas se redondean formando amastigotes, a mitad del intestino se transforman en epimastigotes que se replican mediante fisión binaria y finalmente, aproximadamente 2 semanas después, llegan al recto, donde se convierten en tripanosomas metacíclicos. 6, La picadura del insecto y depósito de los parásitos simultáneamente inicia de nuevo el ciclo.



Una vez en el interior del hospedador, los tripomastigotes tienen la capacidad de invadir gran variedad de células. La entrada en éstas ocurre a través de un proceso que implica la formación de una vacuola cuya membrana resulta de la membrana plasmática de la célula y de la fusión de los lisosomas durante el proceso de internalización del parásito. El ciclo de vida de *T. cruzi* continúa tras la salida del parásito de la vacuola parasitófora al citosol, donde los parásitos continuarán y culminarán la transformación hacia amastigotes. Éstos, tras un periodo de aproximadamente 20 horas, comenzarán a dividirse activamente con un tiempo de replicación de unas 12 horas, de modo que se pueden generar unos 500 parásitos por cada uno internalizado [Dvorak, 1975]. Tras completar el periodo replicativo, los amastigotes se transformarán de nuevo en tripomastigotes, que saldrán de la células huésped, pudiendo llegar a infectar células adyacentes o bien, a través del tejido intersticial, alcanzarán la circulación sanguínea, pudiendo infectar otros tejidos. Las formas tripomastigotas sanguíneas serán ingeridas por el insecto vector durante la picadura, completándose así el ciclo de vida del parásito. En la naturaleza, *T. cruzi* se mantiene principalmente en un ciclo selvático que involucra a ciertas especies de triatominas que actúan como vector, y a varios mamíferos salvajes, como zarigüeyas, mapaches y ratas. Sin embargo, la invasión humana de la selva ha facilitado el contacto de las chinches y los animales salvajes infectados con el hombre, introduciendo así un ciclo peri-doméstico. Ciertas especies de triatominas como *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus* tienen mayor propensión a invadir y anidar en casas, por lo que con mayor frecuencia son responsables de la transmisión de la infección al hombre. La colonización de hábitats humanos se encuentra frecuentemente ligada a la pobreza rural. Varios factores se encuentran involucrados. En construcciones por debajo de los estándares recomendados, las grietas y hoyos de las paredes sin recubrimiento y los techos de paja, proveen escondite adecuado para las chinches, facilitando la infestación. Además la localización de los pesebres para animales cerca de la casa-habitación y la proximidad con la naturaleza contribuyen a la transmisión de la enfermedad.

En general, los cambios de estadio en *T. cruzi*, implican importantes cambios morfológicos y bioquímicos. Las formas epimastigotas y tripomastigotas son flageladas y deben adaptarse a medios que cambian radicalmente durante la transmisión bidireccional vector-hospedador. Estas formas deben soportar, en principio, el peso de los sistemas de defensa de los organismos parasitados así como cambios térmicos. Por otro lado, las formas amastigotas no

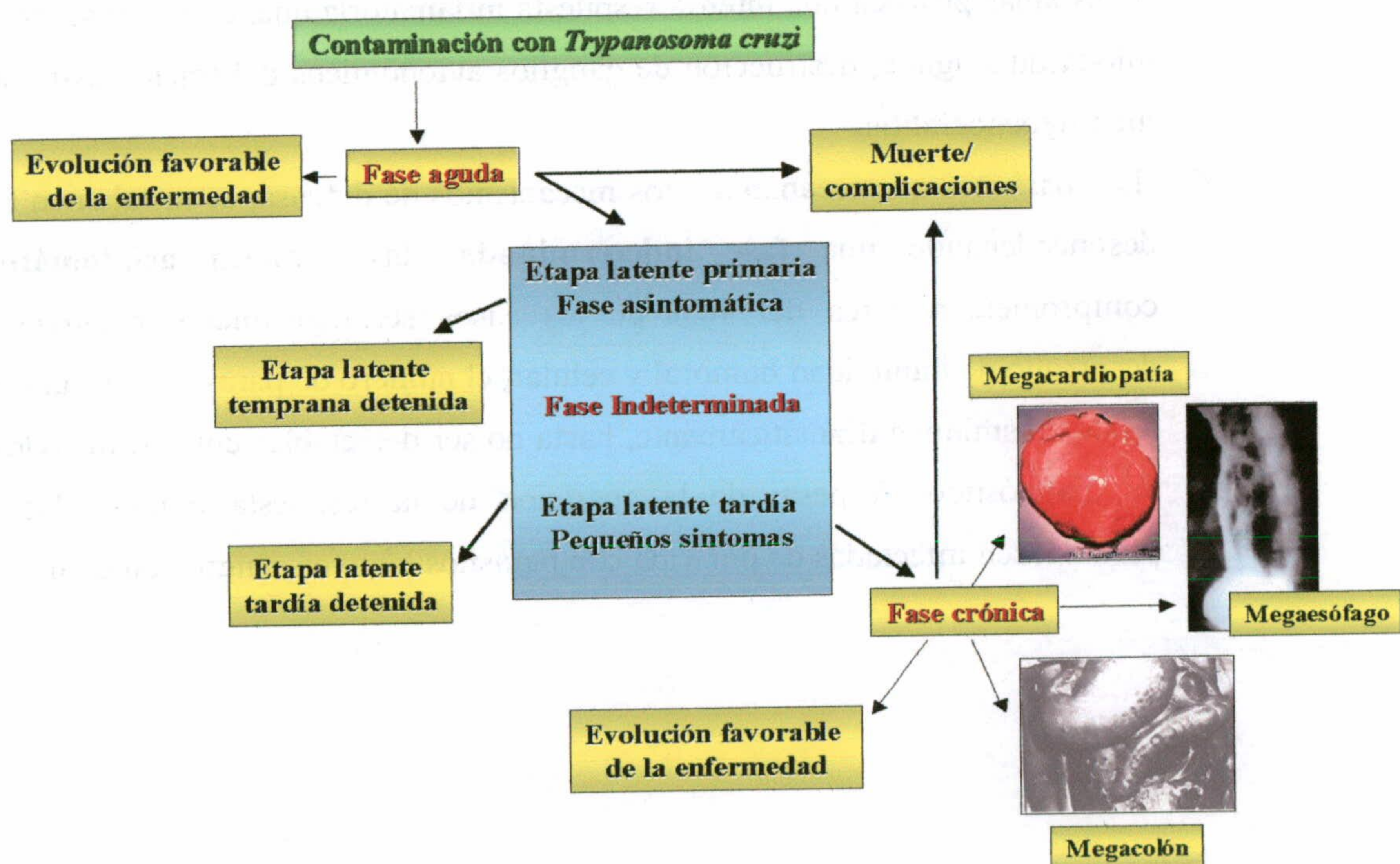


tienen flagelo y, al ser intracelulares, se hallan en parte protegidas de las defensas del medio aunque deben hacer frente a otros problemas.

## II.2.2 La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es endémica en América del Sur y Central. Según la OMS, hay entre 18 a 24 millones de personas infectados por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, y existen unos 100 millones de individuos en riesgo de contraer la enfermedad por vivir en áreas y en condiciones que favorecen el contacto con el insecto vector [TDR, 1991-1992].

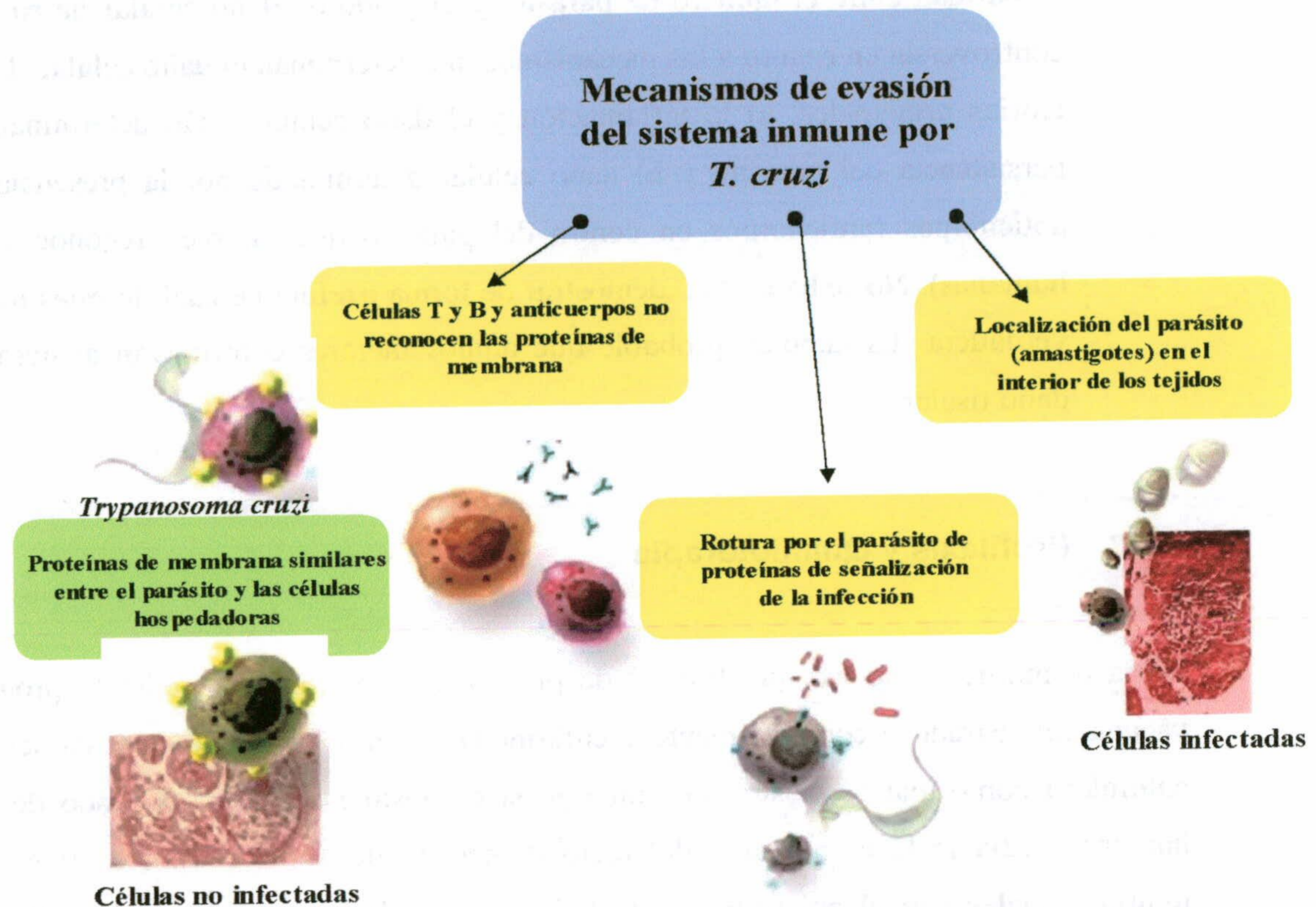
*T. cruzi* es capaz de invadir cualquier tipo de tejido, dependiendo de éste las manifestaciones clínicas de la enfermedad:



**Figura II.13.- Progresión de la enfermedad de Chagas.** Principales etapas observadas en un proceso causado por *T. cruzi*. Se observan las principales consecuencias de la fase crónica de la enfermedad: cardiopatías y megasíndromes de distinto tipo.



- ✓ La primera etapa de una infección por el parásito se caracteriza por una **fase aguda**, en la que puede haber manifestaciones locales (edemas, “chagoma” cuando es en la piel, “signo de Romaña” cuando es a través de la membrana ocular), alrededor de la zona de entrada del parásito, y una parasitemia alta. Esta fase puede durar hasta dos meses, y presenta una mortandad de hasta el 10%, sobre todo en la población infantil e individuos inmunodeprimidos [Brener, 1980]. La capacidad del hospedador para resolver la fase aguda depende de mecanismos de respuesta inmune como la producción de anticuerpos, inmunidad mediada por células, y activación inespecífica de macrófagos, que en una acción conjunta intentan reducir el número de parásitos circulantes [Petry y Eisen, 1989]. En términos generales, en esta fase el parásito se multiplica rápidamente ya que no hay ni reacción inflamatoria alrededor de las células parasitadas, ni una respuesta inmune específica. La ruptura de las células parasitadas provoca una intensa respuesta inflamatoria que, en casos severos, causan miocarditis aguda, destrucción de ganglios autonómicos del tracto gastrointestinal y meningoencefalitis.
- ✓ Los parásitos que escapan a estos mecanismos de defensa, se instalan en los tejidos desencadenando una **fase indeterminada** (fase crónica **asintomática**), que compromete a cerca del 40% de los casos serológicamente positivos. Con el desarrollo de inmunidad humoral y celular, el número de parásitos en sangre y en los tejidos disminuye dramáticamente, hasta no ser detectables con los métodos usuales de diagnóstico. A pesar de la aparición de la respuesta inmune, las personas permanecen infectadas de por vida con parásitos tanto en sangre como en los tejidos.



**Figura II.14.- Principales mecanismos de respuesta del parásito frente al sistema inmune del hospedador**

- ✓ Por último, una **fase crónica** que se caracteriza por parasitemias muy bajas y no presentar manifestaciones clínicas. Aproximadamente en un 20% de los casos aparecen una serie de patologías degenerativas, que suelen producir alteraciones de tipo neurológico, cardíaco (arritmias) o digestivo (megaesófago, megacolon). La mayoría de los individuos infectados crónicamente permanecen asintomáticos, y el daño tisular se limita a pequeños focos de inflamación y de fibrosis con pérdida limitada de los ganglios autonómicos. En los casos de cardiopatía chagásica severa, hay destrucción importante de las células musculares cardíacas y del tejido de conducción con fibrosis difusa e infiltrado inflamatorio importante. En los pacientes con afección gastrointestinal hay destrucción severa de los ganglios autonómicos. Este tipo de manifestaciones pueden tardar años en aparecer y el origen de los mecanismos que subyacen a su aparición sigue siendo muy discutido. La notoria



disparidad entre el número de parásito y el grado de daño celular ha causado gran controversia en cuanto a los mecanismos que determinan el daño celular. Existen dos teorías principales: a) la inflamación y el daño celular están determinados por la persistencia del parásito y b) daño celular determinado por la presencia de auto-anticuerpos (anticuerpos en contra del parásito que también reconocen proteínas humanas). No se ha podido demostrar de forma irrefutable cuál de estas teorías es la verdadera. Es también probable que ambos factores contribuyan al desarrollo del daño tisular

### II.2.3 Profilaxis y Quimioterapia

Hasta el momento no hay posibilidad de prevenir la enfermedad mediante programas de vacunación. Erradicar completamente la enfermedad es muy difícil, ya que ésta persiste en la naturaleza como una zoonosis. Sin embargo si es posible controlar el grado de infección humana mediante la eliminación del ciclo doméstico de *T. cruzi*. Existen tres iniciativas multinacionales con el objetivo principal de prevenir la transmisión de la enfermedad de Chagas a través del control de la población de los vectores y a través del muestreo de los bancos de sangre para detectar la presencia de parásitos.

- a) La iniciativa del cono Sur, iniciada en 1991 con el objeto eliminar la enfermedad de Chagas de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay.
- b) La iniciativa de los Andes para la eliminación de la enfermedad de Chagas en Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela.
- c) La iniciativa de Centroamérica para la eliminación de la enfermedad de Chagas en Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá.

Estas dos últimas iniciativas arrancaron en dos fases: la primera, iniciada en 1993, se concentró en el monitoreo de sangre para transfusión; la segunda, inaugurada en 1997, se enfocó al control de las poblaciones de vectores. La iniciativa del cono sur ha sido altamente exitosa. Entre 1985 y 1997 se logró una reducción de la incidencia de infección por *T. cruzi* del 70% en jóvenes. Países como Uruguay o Chile han tenido éxito en su lucha contra la enfermedad, poniendo en marcha planes de detención de la transmisión del parásito por el insecto vector, a través del uso de insecticidas y de programas de educación sobre las



condiciones de seguridad de los lugares endémicos. El uso de violeta de genciana en los bancos de sangre, ha permitido la eliminación de los parásitos de las reservas de sangre [Docampo y Moreno, 1990]. Así, y a partir de la iniciativa del Cono Sur, Chile y Brasil fueron certificadas libres de la transmisión vectorial y por medio de transfusiones en el año 1999 y en el 2000, respectivamente. A pesar de que han sido ensayados un gran número de compuestos, casi todos se han descartado debido a su ineficacia o alta toxicidad. Solo dos fármacos son actualmente aceptados por la OMS para el tratamiento de la enfermedad: el nifurtimox (un derivado nitrofurano) y el benzonidazol (un derivado nitroimidazol). La susceptibilidad a estos fármacos varía según la cepa utilizada [Brener y col., 1976] y la resistencia natural a ambas drogas [Filardi y Brener., 1987]. Durante la fase aguda pueden utilizarse estos fármacos aunque su uso se restringe en la fase crónica debido a su alta toxicidad [Gorla y col., 1988].

Fármaco	Dosis	Duración del tratamiento
<b>Nifurtimox</b> (“Lampit”)	<b>Adultos:</b> > 17 años: 8-10 mg/Kg  <b>Niños:</b> 1-10 años: 15-20 mg/Kg 11-16 años: 12.5-15 mg/Kg	90 a 120 días
<b>Benzanidazol</b> (“Rochagan, Radanil”)	<b>Adultos:</b> > 12 años: 5 mg/Kg  <b>Niños:</b> < 12 años: 10 mg/Kg	30 a 60 días

Figura II.15.- Tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Sin embargo, la búsqueda de una quimioterapia efectiva se hace fundamental, sobre todo en base a los estudios que han demostrado la importancia en el uso de ésta para evitar el curso de la enfermedad hacia la fase crónica. El desarrollo racional de nuevas drogas depende de la identificación de las diferencias entre el metabolismo humano y el parasitario. Avances en los aspectos bioquímicos del parásito han permitido la identificación de nuevas dianas como el metabolismo de esteroides, la prenilación proteica, ciertas proteasas [Engel y col., 2000], y el metabolismo de fosfolípidos [Docampo, 2001]





## **II.3 LA INVASIÓN POR EL PROTOZOO PARÁSITO *TRYPANOSOMA CRUZI***

### **II.3.1 La Infección De Células De Mamíferos Por *T.cruzi***

Los tripanosomátidos, en general, y *Trypanosoma cruzi*, en particular, han desarrollado estrategias de todo tipo y, en ocasiones, altamente sofisticadas con el fin de adaptarse a diferentes ambientes. A lo largo de sus ciclos de vida han de interactuar con distintas condiciones que implican profundas transformaciones morfológicas y fisiológicas con el fin de sobrevivir y crecer. Pueden entrar en contacto con tipos de células muy diversos y hacer frente a las defensas que éstas muestran. Para ello van a desarrollar mecanismos de protección pasiva (imitación molecular, variación antigénica, etc) y de protección activa con la producción, por ejemplo, de factores inmunosupresores que debiliten esas defensas. Evidentemente se puede suponer la existencia de una compleja vía de señalización que opera desde el hospedador al parásito y al revés, y que según hacia donde se dirija determinará o no el éxito de la infección llevada a cabo por el parásito. Actualmente no se han llegado a conocer con profundidad los mecanismos implicados en la parte del parásito que le permitan, a través de rápidas y profundas transformaciones, lograr su completa adaptación.

*T. cruzi* es un patógeno intracelular obligado ya que debe entrar en las células de su hospedador vertebrado para dividirse. Además, tiene la característica de poseer un rango muy amplio de posibilidades en el tipo de células capaz de ser invadidas. De hecho, hasta ahora no se ha identificado ninguna línea celular resistente a la invasión por *T. cruzi*, lo que sugiere que los procesos implicados deben ser ubicuos y bastante efectivos, posiblemente relacionados con genes "housekeeping". En general, se puede distinguir la invasión en células fagocíticas y en células no fagocíticas.

### **II.3.2 Invasión de células fagocíticas por *T. cruzi***

Se han realizado numerosos estudios sobre la interacción del parásito con los macrófagos, ya que éstos representan una de las principales rutas de establecimiento de la infección. Tanto epimastigotes no infectivos como tripomastigotes infectivos entran en las células fagocíticas



a través de la formación de una vacuola parasitófora; [Tanowitz y col., 1975; Milder y Kloetzel., 1980; Meirelles y col., 1983; Carvalho y col., 1989], siendo únicamente los últimos los que escapan de la vacuola, diferenciándose en el citoplasma a formas amastigotas, que tras varias generaciones de replicación, se diferencian a tripomastigotes, que saldrán de la célula hospedadora al ambiente extracelular.

Fenton Hall y col., demostraron en 1991 que las glicoproteínas de la membrana plasmática que son incorporadas a la membrana de la vacuola que rodea al parásito, son distintas según cuál sea el estadio del parásito que se internaliza. Estas diferencias parecen reflejar, en parte, una unión selectiva de los receptores de la superficie celular que median la entrada. A pesar de que la entrada de los estadios infectivos y los no infectivos pueda estar mediada por diferentes receptores, glicoproteínas de la membrana lisosomal (lgps) se incorporan a la vacuola, sugiriendo la misma vía de entrada en ambos casos.

En general, el mecanismo por el que los tripomastigotes entran en los macrófagos ha sido objeto de controversia bastante tiempo: por un lado, algunos investigadores sostenían que la entrada se bloqueaba en presencia de inhibidores de la polimerización de actina [Nogueira y col., 1976; Meirelles y col., 1982], y otros no encontraban tal inhibición, determinando que la invasión era un proceso activo por parte del parásito [Kipnis y col., 1979]. La posterior observación de un mecanismo de entrada independiente de citocalasina para tripomastigotes en células no fagocíticas, puso de manifiesto que en los macrófagos podía ocurrir simultáneamente tanto una entrada activa, dependiente de  $Ca^{2+}$  y kinasas específicas, como una fagocitosis pasiva.

Los macrófagos pueden ingerir directamente las formas amastigotas, que escapan del fagolisosoma y se replican normalmente en el citosol [Ley y col., 1988]. A diferencia de los tripomastigotes, que invaden preferentemente los márgenes de la célula hospedadora, los amastigotes se unen aleatoriamente a la superficie celular [Mortara, 1991].

En 1998 Villalta y col., describieron una ruta de señalización en el proceso de infección de macrófagos a través de la glicoproteína gp83 que utilizaba la ruta de MAP kinasas, potenciando la fosforilación de ERK-1 y de otras proteínas del macrófago.

Desde el punto de vista de la célula huésped, en este caso los macrófagos, en un proceso infectivo son activados por citokinas, especialmente por interferón- $\gamma$ , desarrollando mecanismos de defensa que implican la activación de los elementos que intervienen en procesos oxidativos, generando intermediarios de óxido tóxicos, así como la participación



del ácido nítrico [Nathan y col., 1979; Ho y col., 1992]. Estos mecanismos pueden matar eficientemente a los tripomastigotes intracelulares [Reed, 1988]. Por otra parte, se ha descrito que las formas infectivas de *T. cruzi* excretan sustancias como poliaminas que incrementan el pH citoplasmático de la célula fagocítica evitando la fusión lisosomal a la vacuola parasitófora, y permitiendo la supervivencia del parásito hasta su salida al citoplasma [Osuna y col., 1986].

### II.3.3 Invasión de células no fagocíticas por *T. cruzi*

Cuando se estudia el mecanismo de entrada del parásito en células no fagocíticas, se observa que es distinto de la fagocitosis clásica. La invasión ocurre lentamente, como se observa en estudios de microscopía grabados en video, donde parece que se necesitan entre 5-10 minutos para la completa internalización y acontece en un lugar específico de la célula hospedadora sin que se produzcan extensiones de pseudópodos ni ninguna otra alteración obvia de la membrana plasmática durante todo el proceso [Schenkman, 1988].



**Figura II.16.- Mecanismo de entrada de *T. cruzi* en células no fagocíticas.** La observación realizada con microscopio electrónico de barrido no reveló en ningún caso la existencia de alteraciones en la membrana plasmática de la célula huésped.



Parece que la entrada del parásito no es inhibida por citocalasina D, cuya presencia, en cambio, parece favorecer el proceso [Tardieux y col., 1992]. Asimismo, la tinción de los microfilamentos de la célula hospedadora con faloidina, permitió comprobar que los tripanosomas recientemente internalizados no estaban rodeados de una capa de F-actina. El hecho de que la entrada de *T. cruzi* sea independiente de la polimerización de la actina, y el que la eliminación del citoesqueleto de actina cortical facilite el proceso, es inusual, y difiere de la invasión desarrollada por otros patógenos bacterianos [Falkow y col., 1992]. Sin embargo, se ha observado en el proceso de invasión de células HeLa por tripomastigotes, la extensión de pseudópodos alrededor de los parásitos, y la tinción con faloidina en el sitio de invasión [Schenkman y Mortara., 1992]. El hecho de que estas observaciones no se hayan podido verificar en otro tipo de células como fibroblastos o células epiteliales renales, parece indicar que estos acontecimientos se hallan restringidas a las células HeLa.

Usando anticuerpos frente a lgp120 (glicoproteínas de la membrana lisosomal) y mediante estudios de microscopía electrónica, se observó un reclutamiento y agrupamiento lisosomal antes del comienzo de la internalización, y cómo los marcadores lisosomales se asociaban a la vacuola nuevamente formada [Tardieux y col., 1992], e incluso a vacuolas parcialmente formadas y antes de que los parásitos hubieran sido completamente internalizados [Hall y col., 1992]. Estos datos sugieren que la entrada del parásito implica la formación de una vacuola, que, teniendo en cuenta la morfología del proceso de entrada en células no fagocíticas y la aparente ausencia de actina, parece implicar la fusión gradual y temprana de los lisosomas para desarrollar la membrana requerida para la formación de la vacuola que rodea al parásito en el momento de la entrada en la célula huésped.

La fusión de lisosomas con vacuolas intracelulares conteniendo a *T. cruzi*, había sido descrita anteriormente [Kress y col., 1975; Milder y Kloetzel., 1980; Meirelles y de Souza., 1983; Carvalho y de Souza., 1989].

Generalmente, los lisosomas se encuentran agrupados en la región perinuclear de las células animales asociados con el centro de organización de los microtúbulos con una distribución que, aunque requiere una red de microtúbulos intactos, es independiente de microfilamentos de actina y de los filamentos intermedios [Matteoni y Kreis., 1987]. Normalmente, el material internalizado por las células y destinado a la degradación, se une a los lisosomas tras la migración al área perinuclear en un proceso que requiere de 15 a 30 minutos. Sin



embargo, poco después de la interiorización del tripanosoma, los lisosomas secundarios se fusionan con fagosomas y 24 a 96 horas después aparecen amastigotes libres en el citoplasma [Kress y col., 1975; Tanowitz y col., 1975; Nogueira y Cohn, 1976; Milder y Kloetzel, 1980; Nazareth y col., 1986].

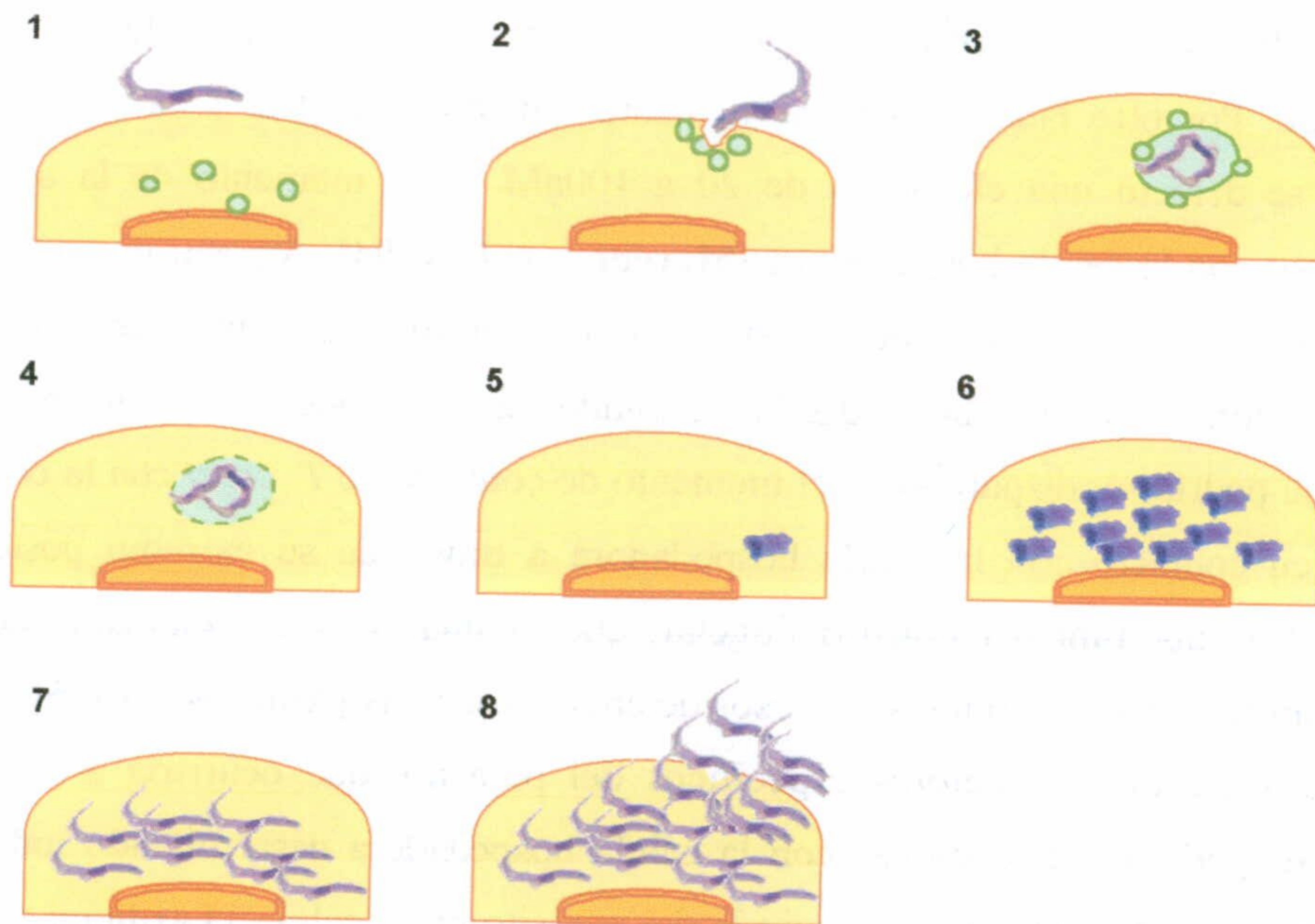
Esta hipótesis fue reforzada mediante manipulación experimental de la distribución celular y la capacidad de fusión de los lisosomas. La acidificación del citosol [Heuser, 1989] o tratamiento con drogas que, por diferentes mecanismos, inducen una dramática migración de lisosomas desde el área perinuclear a la periferia celular de forma dependiente de microtúbulos [Tardieux y col., 1992], aumentó la invasión de *T. cruzi* en células NRK, mientras que la alcalinización, que induce el agrupamiento perinuclear de los lisosomas, tuvo el efecto opuesto. Condiciones que interferían no con la localización sino con la capacidad de fusión de los lisosomas, originaron una reducción de la invasión por tripomastigotes en un 50%. La baja velocidad de infección por *T. cruzi* en células mitóticas [Dvorak y Crane., 1981; Tardieux y col., 1992], periodo durante el que todos los eventos de fusión de membranas intracelulares son bloqueados [Warren, 1985] probablemente debía a este hecho el resultado, y no a la pérdida de receptores de superficie como se había descrito previamente [Dvorak y Crane., 1981; Zingales y Colli., 1985]. Con todos estos datos y conociendo que *T. cruzi* muestra una clara preferencia por invadir los márgenes celulares [Schenkman y col., 1988], se sugería fuertemente la participación de los lisosomas en el proceso de invasión. Este proceso de reclutamiento lisosomal y fusión temprana en el sitio de internalización del parásito es único, y muy diferente de la fagocitosis clásica, revelándose un mecanismo nuevo para la invasión celular que implica la existencia de procesos de señalización entre el parásito y la célula hospedadora.

En este sentido, el  $\text{Ca}^{2+}$  se consideró un firme candidato como segundo mensajero en la célula huésped, ya que está implicado en la reorganización del citoesqueleto cortical de actina y en la fusión lisosomal [Andrews, 1995]. Además se observó que en el momento del contacto de los tripomastigotes infectivos con la célula diana, se producían rápidas y repetitivas elevaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las células NRK, pocos segundos después de la exposición a los parásitos, y que duraban más de 10 minutos [Tardieux y col., 1994]. Cuando se bloquean de alguna forma la producción de esos transientes, se inhibe la invasión del parásito indicando el requerimiento de los transientes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el proceso [Mortara, 1991; Tardieux y col., 1994; Rodríguez y col., 1995]. Además, los mismos protocolos no



inhiben la ingestión de partículas por fagocitosis, aunque sí interfieren con la fusión lisosomal [Jaconi y col., 1990]. Por tanto, el mecanismo de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  podría estar implicado en el reclutamiento de lisosomas de la célula hospedadora que conduce a la invasión. Por otro lado, cuando se realizaron medidas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en tripomastigotes de *T. cruzi*, se detectó una elevación de 20 a 100nM en el momento de la asociación de los parásitos con la célula hospedadora [Moreno y col., 1994]. A pesar de que la cinética de la respuesta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de tripos y su relación con los transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula hospedadora no se han estudiado, los resultados sugieren que un mecanismo de señalización cruzada podría ser disparado en el momento de contacto de *T. cruzi* con la célula. El parásito entra en contacto con la célula hospedadora a través de su extremo posterior, donde se localiza la apertura del bolsillo flagelar, que es una zona especializada de la membrana plasmática donde ocurren los procesos de endo-exocitosis [Andrews, 1995]. Se ha postulado que la secreción de factores específicos del parásito, que ocurriría a través del bolsillo flagelar, podrían interaccionar con la célula hospedadora desarrollando todo el proceso de señalización que conduce a la entrada del parásito en la célula [Tardieux y col., 1992]. En este sentido se ha caracterizado la proteinasa Tc80, secretada por las formas infectivas del parásito, que produce la hidrólisis de ciertos componentes de la matriz extracelular, favoreciendo la entrada del parásito [Grellier y col., 2001].

Si consideramos que los tripomastigotes inducen transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que provocan rápidos rearrreglos del citoesqueleto de actina [Rodríguez y col., 1995] y que se traducen en la despolimerización de los microfilamentos de actina, lo que favorece la invasión [Schenkman y col., 1991a; Tardieux y col., 1992], y si a esto unimos que es posible inducir la fusión de los lisosomas convencionales con la membrana plasmática de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , temperatura y ATP [Rodríguez y col., 1997], se deduce que el mecanismo de invasión de la célula hospedadora por *T. cruzi* está mediado por la fusión lisosomal que depende de incrementos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por el parásito [Tardieux y col., 1994].



**Figura II.17.- Entrada de *T. cruzi* hacia el citosol de la célula huésped.** Etapas principales en el proceso de invasión llevado a cabo por el parásito. **1**, contacto inicial del parásito con la membrana plasmática; **2**, reclutamiento de lisosomas perinucleares hacia el sitio de contacto inicial; **3**, fusión de los lisosomas con la membrana plasmática formando la vacuola fagolisosómica; **4**, conjunto de acontecimientos que conduce a la rotura de la vacuola fagolisosómica; **5**, salida del parásito al citosol, donde terminará su transformación a la forma amastigote, **6**, replicación de la forma amastigote en el citosol; **7**, viraje de la forma amastigote a la forma tripomastigote; **8**, rotura de la célula huésped y salida del parásito

La fusión de los lisosomas con la membrana plasmática independientemente de la fagocitosis se ha descrito sólo como parte de la ruta exocítica de algunas células especializadas [Tardieux y col., 1992]. Se ha descrito que, cuando existe algún daño en la membrana plasmática, la entrada de  $Ca^{2+}$  subsiguiente conduce a la exocitosis de vesículas, del tipo lisosomal, hacia el sitio del daño de la membrana [Caler y col., 1998; Reddy y col., 2001]. La importancia de este hecho radica en que parece que *T. cruzi* se haya aprovechado de la existencia de una ruta de transducción de señal reguladora de la fusión y el reclutamiento lisosomal para llevar a cabo su proceso infeccioso [Andrews, 2002].



## **II.4 ACONTECIMIENTOS EN LA INVASIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI***

En el proceso de invasión llevado a cabo por *Trypanosoma cruzi*, se pueden distinguir varias etapas. En primer lugar, existe una interacción inicial entre el patógeno y la célula que dará lugar a la entrada del mismo mediante la formación de una vacuola parasitófora. A continuación, se produce el escape del parásito de la vacuola al citosol donde ocurre la multiplicación del mismo. Finalmente, y tras desarrollarse suficientemente y virar al estadio adecuado, tiene lugar el escape de la célula tras lisis de la misma. Todos estos acontecimientos son, en realidad y pese a la importancia que tienen en el desarrollo del parásito, muy poco conocidos.

### **II.4.1 Interacción del parásito con la célula hospedadora.**

El proceso de reconocimiento e interacción entre las membranas de la célula hospedadora y un organismo invasor, son los primeros pasos en la serie de acontecimientos que conducen a un proceso de infección [Nogueira y Cohn., 1976; Alcántara y Brener., 1980; Andrews y Colli., 1981; [Villalta y Kierszenbaum., 1985; Boschetti y col., 1987; Capron y Dessaint., 1989; De Souza., 1989] Esta interacción puede ser inespecífica en muchas infecciones, pero existen otros casos con evidencias de reconocimiento entre los sitios del organismo invasor y la célula huésped.

Históricamente, los estudios de interacción célula hospedadora-patógeno, se han enfocado a la identificación de posibles receptores en la célula y a la identificación de proteínas de superficie asociadas a los estadios infectivos del parásito y que pudieran estar implicadas en el proceso de reconocimiento. Respecto a la infección por *T. cruzi*, el primer hecho que llama la atención es el que las formas tripomastigotas puedan infectar gran cantidad de células de mamífero, tanto macrófagos como células fagocíticas no profesionales: fibroblastos, células epiteliales, endoteliales, musculares y nerviosas, lo que sugiere que el reconocimiento de la célula diana puede estar mediada por receptores, ya que no todos los tejidos son infectados y, para un mismo tejido, las distintas cepas presentan diferentes especificidades [Piras y col., 1983; Snary., 1985; Zingales y Colli., 1985; de Araujo-Jorge, 1989].





Sin embargo, cuando se llevan a cabo estudios de interacción de células de mamíferos con tripomastigotes de *T. cruzi* en cultivo *in vitro*, se observa que en el proceso de unión e invasión que desarrolla el parásito aparecen implicadas un gran número de moléculas y procesos. Así, cuando se producen diferentes modificaciones de las glicoproteínas de superficie de la membrana y/o de la arquitectura de células fibroblásticas hospedadoras, se produce una alteración en la infección por *T. cruzi*, lo que sugiere que la membrana de estas células no tiene un papel pasivo en el proceso de infección. Por otro lado, cuando se utiliza un anticuerpo dirigido frente a un epítipo antigénico de superficie de la membrana de *T. cruzi*, se produce una disminución de la infectividad sobre células LLCMK2 de aproximadamente un 34% respecto al efecto que causa el suero preinmune [Martiny col., 1997]. En distintos sistemas se ha podido observar, realizando estudios *in vitro* que ciertos glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) del parásito y de la célula participan en el proceso de invasión, siendo el dominio carbohidrato de estas moléculas el que parece participar en este tipo de interacción [Andrews y Colli., 1981; Barbosa y Meirelles., 1992; Vermelho y col., 1992]. Existen muchos y distintos tipos de carbohidratos (galactita, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, manosa y ácido siálico) que componen los glicoconjugados de superficie, tanto de *T. cruzi* como de la célula hospedadora y que están involucrados en el proceso. Recientemente se ha descrito que diferentes proteínas de la superficie de los tripomastigotes son capaces de unirse a componentes de la matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno), confirmando la posibilidad de que la interacción con la célula hospedadora ocurra a través de proteínas de la matriz [Manque y col., 2000]. También se ha propuesto la intervención de fosfolípidos del parásito, que al interactuar con la célula diana, sufren cambios en la composición y organización, lo que parece influir en el proceso de internalización, así como en la activación de rutas de señalización dirigidas a la expresión de genes que regulan la invasión y/o los procesos de diferenciación del parásito [Garrido y col., 2000].



<i>Molécula</i>	<i>Función</i>	<i>Referencia</i>
<b>Manosa</b>	Su eliminación de la superficie celular disminuye la invasión	Villalta y Kierszenbaum., 1983
<b>Ácido siálico</b>	Su eliminación de la superficie celular disminuye la invasión	De Titto y Araujo., 1987
<b>Galactosa</b>	Su eliminación de la superficie celular disminuye la invasión	Villalta y Kierszenbaum., 1984
<b>Integrinas</b>	Receptores que unen matriz extracelular y fibronectina al citoesqueleto cortical y que están implicadas en transducción de señales.	Fernández y col., 1993 Burleigh y Andrews., 1995.
<b>Fibronectina (Fn)</b>	Nexo de unión entre el parásito y la célula por unión a $\beta$ -1 integrinas	Pereira, 1990; Ouassi y Capron, 1989;
<b>Receptores I y II del TGF<math>\beta</math> ("transforming growth factor <math>\beta</math>)</b>	Activación de vía de señalización tal vez mediada por sialidasas del parásito que inducen el procesamiento de moléculas precursoras de TGF $\beta$ del hospedador en péptidos activos de la vía de señalización del TGF $\beta$ .	Ming y col.; 1995

Figura II.18.- Moléculas de la célula hospedadora implicadas en la adhesión a *T. cruzi*

Otro tipo de moléculas que parecen tener un importante papel en las etapas iniciales del establecimiento de la invasión celular por *T. cruzi*, son las transialidasas de superficie [Schenkman y col., 1994]. Diferentes estudios corroboran su participación: se conoce que la invasión se potencia cuando se lleva a cabo un pretratamiento de los parásitos con la sialoglicoproteína fetuina, pero no con la ailofetuina [Piras y col., 1987]; la invasión se inhibe cuando se utilizan anticuerpos frente a epitopos que contienen ácido siálico en la superficie de los tripomastigotes [Schenkman y col., 1991b; Ruiz y col., 1993]; la ausencia de residuos de ácido siálico en la superficie de las células hospedadoras reduce la entrada del parásito [Schenkman y col., 1993b; Ming y col., 1993; Ciavaglia y col., 1993], y el enzima purificado, que compite específicamente con la transialidasa, al ser añadido al medio de cultivo, inhibe la invasión [Schenkman y col., 1993a; Ming y col., 1993]. De aquí se deduce que la transialidasa sea requerida tanto para la deposición de residuos de ácido siálico sobre la superficie de los tripomastigotes como para actuar como ligando sobre los residuos de ácido siálico de la célula hospedadora. De hecho, se piensa que la transialidasa estabiliza el proceso de internalización al unirse a los motivos de ácido siálico de las glicoproteínas lisosomales (lgps), estableciendo así una fuerte unión entre las membranas del parásito que está siendo internalizado, y la de la vacuola fagolisosómica en la que esos residuos quedan gradualmente expuestos al fusionarse los lisosomas con la membrana plasmática [Tardieux



y col., 1992]. De aquí se puede explicar en parte, la capacidad de *T. cruzi* para invadir diversos tipos celulares. Puede que el parásito utilice diferentes receptores sobre la célula hospedadora que tengan alguna propiedad común, como por ejemplo la carga negativa. Moléculas cargadas negativamente como ácido siálico o heparán sulfato podrían actuar como receptores para el parásito en muchos tipos celulares [Herrera y col., 1994]. La transialidasa de *T. cruzi* pertenece a una gran familia de proteínas de superficie de las que no todas tienen actividad transialidasa [Uemura y col., 1992; Kahn y col., 1993]. Es posible que los miembros enzimáticamente inactivos reconozcan ácido siálico, lo que explicaría el papel propuesto en la invasión del parásito [Alves y col., 1986; Ramirez y col., 1993]. También parecen intervenir en el proceso otras moléculas como glicosaminoglicanos de la superficie de la célula hospedadora, y una molécula de superficie del tripomastigote que se une a la heparina [Ortega-Barria y Pereira, 1991].

Molécula	Función	Referencia
<b>Glicoproteína con actividad neuraminidasa y/o transialidasa</b>	Enzimas con actividad neuraminidasa y/ transialidasa, capaces de transferir ácido siálico entre glicoconjugados del hospedador y del parásito.	Cross y Takle., 1993 Schenkman y Elchinger., 1993
<b>Ácido siálico</b>	Carbohidrato cargado negativamente encontrado en la localización terminal de glicoproteínas y glicolípidos.	Cross y Takle., 1993 Schenkman y Elchinger., 1993
<b>Penetrina (60 Kda)</b>	Componente de la superficie del parásito capaz de unirse selectivamente a tres componentes de la matriz extracelular: heparina, heparán sulfato y colágeno.	Ortega-Barria y Pereira., 1991
<b>gp83</b>	Glicoproteína localizada en la membrana de tripomastigotes que actúa como receptor de fibronectina unida a superficie celular y sanguínea.	Lima y Villalta, 1988 y 1989 Villalta y col., 1990 y 1992 Schenkman y col., 1991b
<b>gp85</b>	Une fibronectina y colágeno. Es uno de los productos de secreción mayoritarios del estadio tripomastigote.	Couto y col., 1987 y 1990.
<b>Proteína de superficie Ssp-3 dependiente de estadio</b>	Monoclonales específicos de residuos de ácido siálico de Ssp-3 inhiben la unión de tripomastigotes a la célula.	Schenkman y col., 1991b
<b>Proteinasa Tc80</b>	Es secretada por el estadio tripomastigote y degrada colágeno tipo I y IV de la matriz extracelular.	Santana y col., 1997.
<b>Glicoproteínas semejantes a mucinas</b>	Familia de moléculas O-glicosiladas ricas en treonina que funcionan como aceptores de ácido siálico en los estados infectivos, y que están implicadas en la interacción con la superficie de la célula hospedadora., así como en la protección de la superficie del parásito.	Di Noia y col., 1995. Yoshida y col., 1997.

Figura II.19.- Moléculas del parásito *T. cruzi* implicadas en la adhesión a la célula hospedadora



Todos los datos obtenidos hasta ahora conducen a pensar que en el proceso de invasión llevado a cabo por *T. cruzi* no existe sólo un típico reconocimiento receptor-ligando, sino que se producen reacciones enzimáticas de distinto tipo, y parece que se trata de un proceso activo que requiere energía por parte del parásito, y en el que el metabolismo de la célula hospedadora no interviene [Schenkman y col., 1991a]. De hecho se han propuesto dos rutas principales de interacción parásito-célula en el proceso de invasión: por un lado a través del reconocimiento de residuos de ácido siálico y transialidasa, y por otro a través de la interacción de la penetrina y heparán sulfato [Ming y col., 1995].

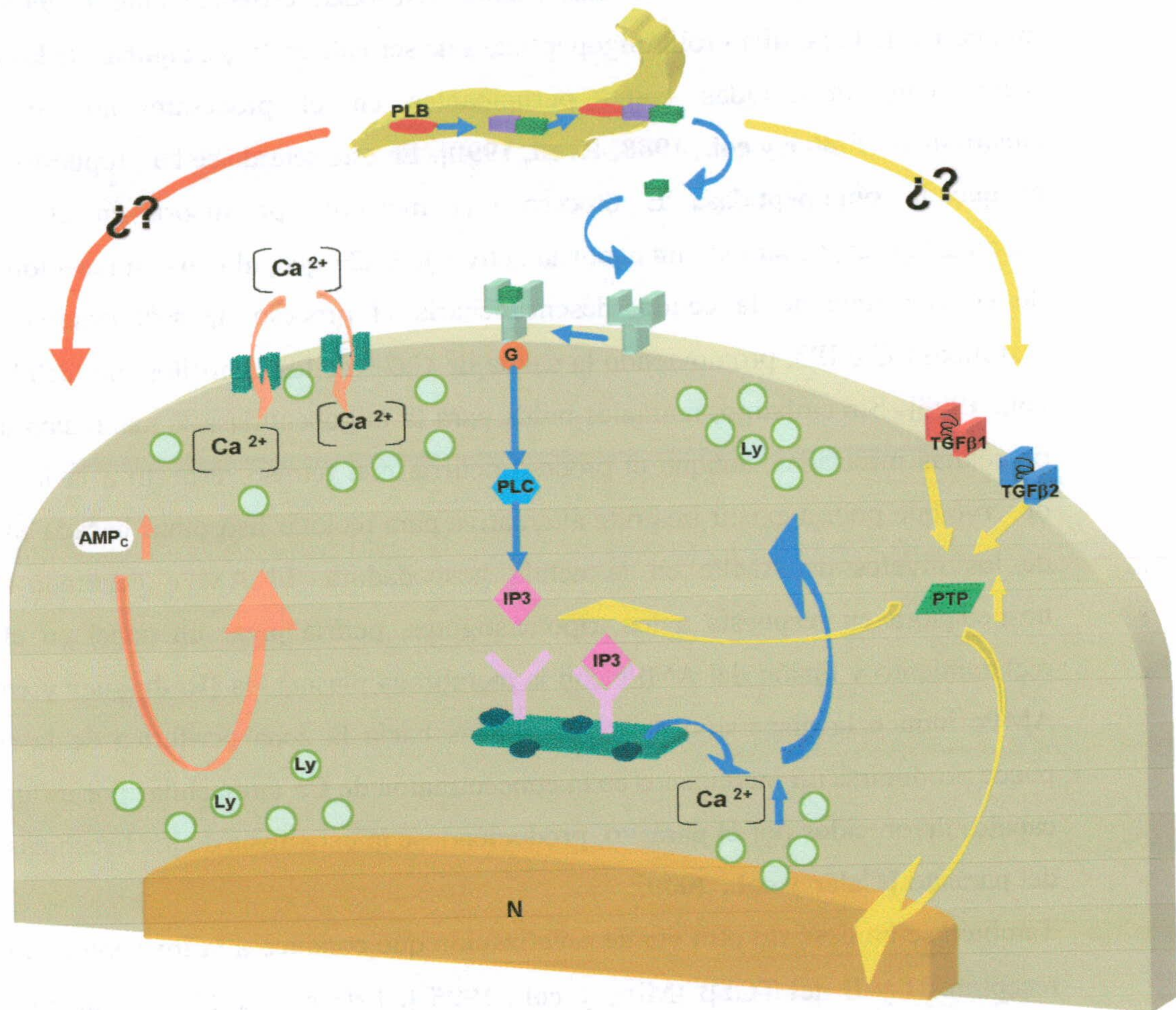
#### II.4.2 Entrada de *T. cruzi* en la célula hospedadora

Los patógenos intracelulares acceden al interior de las células hospedadoras por distintos mecanismos. Algunos, como *Legionella* y *Leishmania*, infectan principalmente células fagocíticas, por lo que se asumía que el mecanismo de internalización era la fagocitosis [Moulder, 1985]. Otros organismos, como *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* y *Shigella*, son capaces de invadir fagocitos no profesionales y la morfología del proceso de entrada parece variar considerablemente entre ellos. En general, se considera que el mecanismo de entrada de la gran mayoría de los parásitos intracelulares estudiados hasta la fecha sería como una “fagocitosis inducida por el parásito”, ya que ganan el acceso al ambiente intracelular dentro de vacuolas rodeadas de actina polimerizada y la entrada se bloquea por citocalasinas.

El mecanismo de entrada de *T. cruzi* en una célula hospedadora es inusual, como se demostró por primera vez con los estudios de microscopía electrónica de barrido realizados sobre células epiteliales y fibroblastos [Schenkman y col., 1988]. La gran mayoría de los tripanosomas inician la invasión por el extremo posterior, la zona donde se localiza la apertura del bolsillo flagelar, y muestran preferencia por unirse a los lamelipodios de los márgenes celulares en células adherentes y a las superficies basolaterales de células polarizadas, ambas regiones caracterizadas por procesos de ensamblaje del citoesqueleto de actina cortical [Schenkman y col., 1988; Heath, y Holifield, 1991]. Después de un contacto inicial, la entrada de *T. cruzi* va acompañada de la formación de una vacuola que lo rodea. El proceso en sí se distingue de la fagocitosis clásica por dos aspectos fundamentales. Por un lado, no se observan pseudópodos ni otras alteraciones de la membrana plasmática de fibroblastos ni células epiteliales durante la entrada del parásito. Y por otro lado, la entrada



ocurre aunque se desorganicen los filamentos de actina con sustancias como la citocalasina D [Schenkman y col., 1991a]. Respecto a la formación de la vacuola, se ha descrito recientemente el importante papel del ácido siálico presente en la superficie luminal de los lisosomas de la célula hospedadora, no solo por su participación en la unión inicial, sino estabilizando el proceso de internalización. Parece que se produce una interacción muy fuerte entre moléculas de la superficie del tripomastigote (posiblemente miembros de la familia de las transialidasas) y los residuos de ácido siálico, lo que parece prevenir la liberación extracelular del contenido lisosomal durante la invasión [Lopez y col., 2002]. Durante el proceso, en respuesta a tripomastigotes vivos o extractos solubles de los mismos, el  $[Ca^{2+}]_i$  es movilizado de los almacenes intracelulares [Tardieux y col., 1994], en un proceso mediado por IP3 [Rodríguez y col., 1995]. Parece que la estimulación de receptores de la membrana plasmática específicos, dispara una vía de señalización en la célula huésped mediada por fosfolipasa C (PLC) e inositol fosfato (IP3) que conduce a la liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares. El incremento de  $Ca^{2+}$  en el interior de la célula conduce a la reorganización de los microfilamentos de actina para facilitar el proceso de invasión [Rodríguez y col., 1995]. Los transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  de la célula hospedadora se han descrito también durante la interacción de *Salmonella typhimurium* [Pace y col., 1993] y *E. coli* [Baldwin y col., 1991] así como en otros parásitos intracelulares como *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum* [Wilkowsky y col., 1996]. Parece que la inducción de transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  en las células de mamíferos está acoplada a la actividad de una peptidasa citosólica del parásito de 120 Kda, denominada oligopeptidasa B [Burleigh y Andrews, 1995]. Sin embargo, la peptidasa purificada no tuvo actividad señalizadora de  $Ca^{2+}$  por sí misma, y se observó que estaba presente en niveles similares en epimastigotes, el estadio no infectivo de *T. cruzi*, que no produce señal en las células hospedadoras [Burleigh y Andrews., 1995]. Se ha descrito que, de acuerdo con sus capacidades infectivas, tanto metacíclicos [Dorta y col., 1995] como tripomastigotes contienen un factor soluble que induce incrementos transientes de  $[Ca^{2+}]_i$  en una variedad de tipos celulares de mamíferos, siendo generado por procesamiento proteolítico a partir de un precursor inactivo, de manera análoga a como ocurre con varias hormonas de mamíferos y factores de crecimiento [Tardieux y col., 1994; Burleigh y Andrews., 1995; Barr y col., 1996]. Burleigh y col., en 1997 describieron que la oligopeptidasa B de *T. cruzi* participa en eventos de procesamiento en el citoplasma del parásito generando un factor con actividad señalizadora de  $Ca^{2+}$  para células de mamíferos.



**Figura II.20.- Principales rutas de señalización en el proceso de entrada en la invasión por *T. cruzi*.** En el esquema se representan tres principales rutas de señalización conocidas hasta ahora, que son usadas por el parásito para entrar en la célula hospedadora. Siguiendo las flechas azules se muestra la ruta usada por el parásito para entrar en la célula hospedadora. Siguiendo las flechas azules se muestra la ruta dependiente de la activación de oligopeptidasa B (PLB). En naranja, aparece la ruta de señalización dependiente de la elevación del AMPc de la célula hospedadora. En amarillo, se muestra la vía que se activa a través de los receptores TGFβ.

G, proteína G; PLC, fosfolipasa C; IP3, inositolfosfato 3; Ca, calcio; PTP, fosfotirosinfosfatasa; Ly, lisosomas, N, núcleo



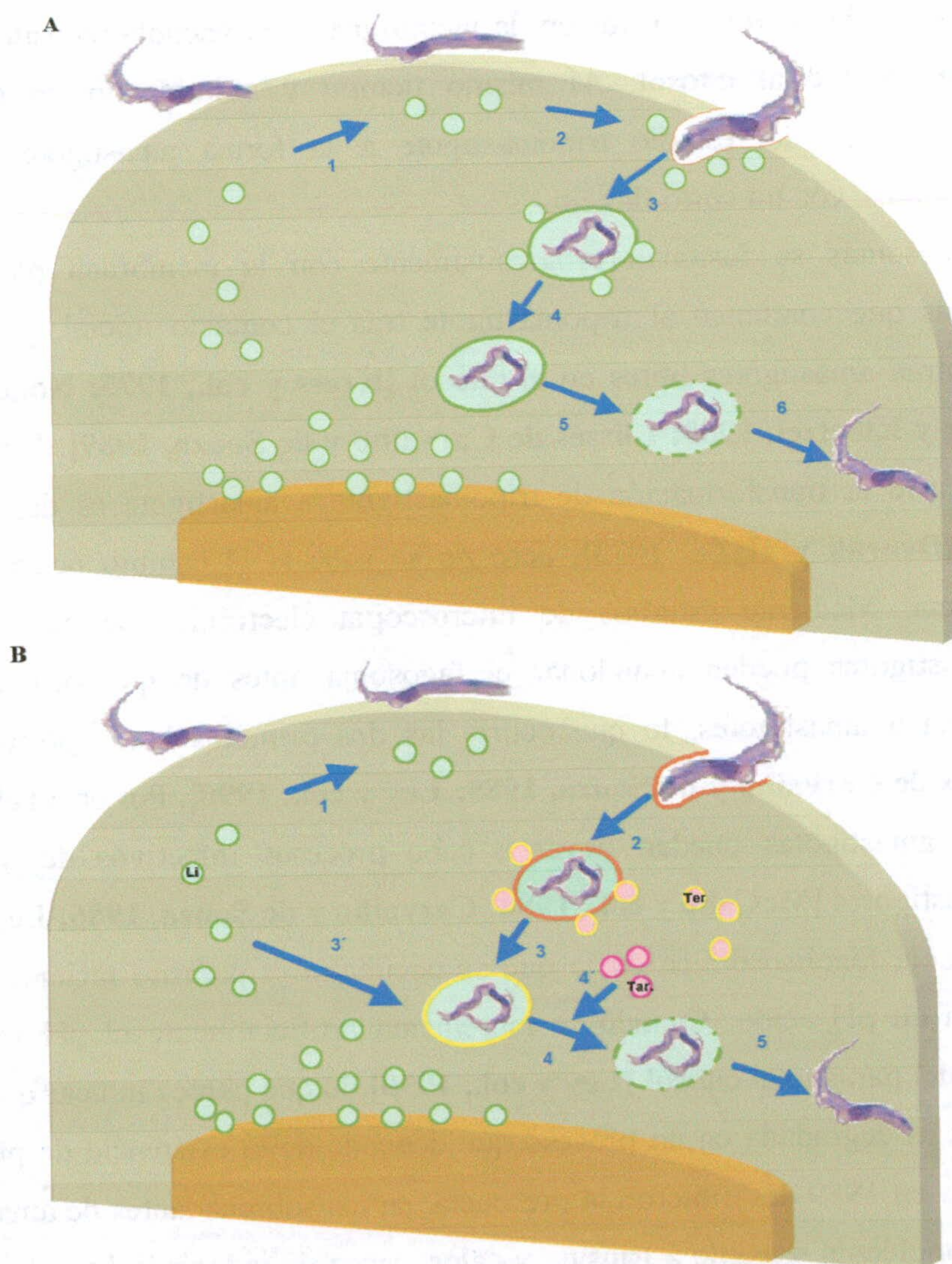
Esta peptidasa de *T. cruzi* es una enzima citosólica estrechamente relacionada con los miembros de la familia proil oligopeptidasa de serinahidrolasas, algunas de las cuales fueron previamente presentadas como participantes en el procesamiento de prohormonas eucarióticas [Fuller y col., 1988; Krell, 1990]. En este sentido se ha propuesto un modelo en el que la oligopeptidasa B procesa una molécula precursora en el citoplasma de tripomastigotes, generando un agonista activo de  $Ca^{2+}$  que, al unirse a receptores específicos de la superficie de la célula, desencadenaría el proceso de señalización mediado por fosfolipasa C e IP3, promoviendo la salida de  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares [Caler y col., 1998]. Sin embargo, mutantes nulos para la oligopeptidasa B mantenían un porcentaje de células infectadas, aunque el proceso ocurría con retraso respecto a la línea salvaje. Se observó que podría existir una ruta alternativa para reclutar lisosomas basada en la elevación de los niveles de AMPc en la célula hospedadora. El AMPc generado en la célula hospedadora en respuesta a los tripomastigotes, podría jugar un papel en el proceso de reclutamiento y fusión del AMPc con la membrana plasmática [Rodríguez y col., 1999]. El AMPc induce la dispersión de los lisosomas hacia la zona periférica de la célula, donde puede producirse un incremento en la concentración de Ca intracelular por influjo a través de canales favorecidos por el parásito, produciéndose la exocitosis de los lisosomas y la entrada del parásito [Caler y col., 2000].

También se ha descrito otra vía de señalización que conduce a la invasión que implica a los receptores I y II del TGF $\beta$  [Ming y col., 1995]. Esta ruta se ha visto acompañada por la defosforilación, inducida por el parásito, de residuos de tyrosina de proteínas implicadas en las vías de transducción de señales comentadas, o implicadas en la regulación de la célula hospedadora [Zhong y col., 1998].

Entre las moléculas del parásito que interaccionan con la célula en este momento de la invasión se encuentra TcMIP, que, al inducir cambios conformacionales en los puentes peptidil-proil debido a su actividad, hace más susceptible a las células a sufrir un proceso infeccioso [Moro y col., 1995]. Otra molécula implicada es la glicoproteína gp82, específica de la superficie de metacíclicos, que parece mediar la fosforilación de un factor soluble, p175, al unirse a un receptor de la célula hospedadora [Favoreto y col., 1998]. Parece que después de la interacción de gp82 con su receptor se produce la activación de la proteína tirosin kinasa (PTK) y fosfolipasa C (PLC), con la consiguiente producción de IP3, que promueve la movilización del  $Ca^{2+}$  [Yoshida y col., 2000].



Últimamente se ha descrito que, antes del reclutamiento de los lisosomas al sitio de contacto del parásito con la célula, hay una asociación de endosomas tempranos y tardíos, que también participan en la entrada del parásito. Se proponen dos posibles rutas de entrada a la célula: dependiente de proteínas Rab y dinamina, en la que existe la formación de un fagosoma que interacciona con endosomas tempranos y tardíos antes de la interacción con los lisosomas; y una vía independiente de Rab y dinamina, en la que se produciría la fusión directa de los lisosomas a la membrana plasmática en el punto de acceso del parásito a la célula [Wilkowsky y col., 2002]



**Figura II.21.- Intervención de los lisosomas en la invasión por *T. cruzi*.** En la figura A se muestra el modelo de acción de los lisosomas (independiente de Rab y dinamina) de la célula huésped en la entrada del parásito conocido hasta el momento. En la figura B se muestra un nuevo mecanismo (dependiente de Rab y dinamina) en el que participan, además de los lisosomas, endosomas tempranos (Ter) y tardíos (Tar).





### II.4.3 Escape del parásito al citosol

Los patógeno intracelulares llevan a cabo distintas estrategias para completar su desarrollo en el ambiente hostil de la célula hospedadora. Para que *T. cruzi* complete con éxito su ciclo de vida, debe escapar de la vacuola fagolisosómica en la que se halla tras la invasión, y replicarse libremente como amastigote en el citosol [Nogueira y Cohn., 1976]. Así, entre 15 minutos y 2 horas tras la invasión, la membrana de la vacuola parasitófora es destruida y el parásito accede al citosol. Al mismo tiempo y culminando en el citosol, ocurre la transformación del estadio tripomastigote a la forma amastigote, formas replicativas, redondeadas, con un corto flagelo.

Los lisosomas se fusionan progresivamente con la membrana plasmática, formándose vacuolas que contienen al tripomastigote tras el contacto inicial, y 24 horas después se encuentran amastigotes libres en el citosol [Kress y col., 1975; Nogueira y Cohn, 1976; Milder y Kloetzel, 1980; Ulisses de Carvalho y de Souza, 1989]. Parece que el tiempo en que ocurre la transformación de tripomastigote a amastigote es de, aproximadamente, 3 horas [Dvorak y Hyde, 1973], pero no se sabe si el cambio ocurre dentro o fuera del fagosoma. Mediante estudios de microscopía electrónica se ha determinado que los tripomastigotes pueden abandonar el fagosoma antes de que ocurra su transformación completa a amastigotes, lo que ocurre las dos primeras horas posteriores a la invasión [Ulisses de Carvalho y de Souza, 1989; Ley y col., 1990]. Por otro lado, se conoce que las formas amastigotas pueden llevar a cabo procesos infectivos de igual forma que los tripomastigotes [McCabe y col., 1984; Carvalho y de Souza, 1986; Ley y col., 1990].

La vacuola fagolisosómica en la que se encuentra el parásito recientemente internalizado, muestra un pH ácido. Cuando se incrementa artificialmente el pH vacuolar se inhibe el escape del parásito al citosol [Ley y col., 1990], lo que parece indicar que la membrana de la vacuola es degradada en un proceso que depende de la existencia de pH ácido. Andrews y Whitlow en 1989 describieron la presencia, en los sobrenadantes de amastigotes de *T. cruzi*, de una molécula sensible a tripsina y calor, capaz de inducir la lisis de eritrocitos de varias especies animales, y cuya actividad máxima ocurría a pH 5.5, siendo indetectable a pH neutro. Esta actividad dependiente de pH sugirió que la hemolisina podría tener un papel en compartimentos ácidos intracelulares. El contacto de la célula diana con el parásito no es



requerido para la lisis ya que se obtienen niveles similares de hemólisis cuando se incuban juntos a pH 5.5 eritrocitos y parásitos o cuando se separan por una membrana de tamaño de poro 0.4  $\mu\text{m}$ , y mantenidos en el mismo medio. Cuando se incuban los medios condicionados a pH 5.5 de amastigotes con eritrocitos (tras eliminar los parásitos) durante 3 horas a 37°C, también se obtiene actividad lítica. La ausencia de D-glucosa en el tampón de incubación o la presencia de inhibidores metabólicos como azida sódica o 2-deoxi-D-glucosa detienen la producción de la hemolisina, lo que sugiere que se trata de un producto secretado. Sin embargo, la adición de EDTA, o-phenantrolina o iodoacetamida no afecta la actividad lítica de los medios condicionados de amastigotes. La actividad proteica purificada fue utilizada para generar anticuerpos en conejo, con los que se inmunodetectó una única banda en los sobrenadantes concentrados o en extractos totales del parásito, y con los que se demostró que la actividad lítica eluía en la misma posición que Tc-TOX. La hemolisina de *T. cruzi* copurifica con una proteína de 60 a 75 Kda inmunológicamente relacionada a C9 humano y las fracciones enriquecidas en esa proteína forman canales iónicos en bicapas de fosfolípidos planares a bajo pH [Andrews y col., 1990]. Los anticuerpos frente a Tc-TOX fueron usados para localizar la proteína. Se inmunolocalizó en el aparato de golgi y bolsillo flagelar de los parásitos y, en finas secciones congeladas de células J774-E infectadas, en el lumen de los fagosomas de estas células. En 1990, Esta proteína podría estar relacionada con la ruptura de la membrana de la vacuola fagolisosómica, contribuyendo al escape del parásito hacia el citosol, de manera análoga al mecanismo de escape de las bacteria patógenas *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri* [Bielecki y col., 1990; Sansonetti y col., 1986].

Un posible modelo de ruptura de la vacuola estaría basado en las siguientes características:

- ⇒ la formación de la vacuola presenta ciertos aspectos como son que el volumen restringido previene la dilución de la neuraminidasa liberada al espacio vacuolar y evita que se inhiba por contacto con componentes séricos,
- ⇒ como es un ambiente acidificado, se produce una liberación potenciada de la enzima, lo que previene la eliminación de residuos de ácido siálico de la superficie del parásito por la acción reversible de la transialidasa, y favorece la desialización de la membrana vacuolar,
- ⇒ mientras continua la acidificación, la actividad de TcTOX aumenta. TcTOX difundiría y se insertaría de forma más fácil en la bicapa de la membrana desializada.



Los primeros indicios de la existencia de una posible actividad hemolítica asociada con *T. cruzi*, se deben a experimentos realizados en eritrocitos humano y de pollo que se incubaron con epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, resultando en la lisis de los glóbulos rojos [Calderón y col., 1986, 1989]. Sin embargo, cuando se usaban parásitos en fase estacionaria se producía fusión antes que lisis, lo que se asoció con la presencia de tripomastigotes metacíclicos en los cultivos. Cuando se digería con tripsina las proteínas de superficie del parásito, se suprimía la capacidad fusogénica aunque no la hemolítica, lo que condujo a pensar que el agente responsable de la actividad hemolítica se encontrase fuertemente embebido en la membrana plasmática del parásito.

Cuando se comparan las cinéticas de experimentos de hemolisis llevadas a cabo en los tres estadios de desarrollo del parásito, la forma amastigote aparece como la más activa, seguida por los tripomastigotes. Cuando se aumentan los tiempos de incubación, se detecta cierta actividad en epimastigotes, la forma multiplicativa que se desarrolla en el insecto vector. Sin embargo, a pH neutro no ocurre hemolisis en ningún caso, ni se puede detectar actividad hemolítica en medios incubados con parásitos a pH 7 y posteriormente acidificados, o en medios condicionados a pH 5.5 y neutralizados después.

Todas estas observaciones sobre la hemolisina de *T. cruzi*, y su actividad en microambientes ácidos de endosomas y fagolisosomas proporcionan evidencias que apoyan la hipótesis que postula la implicación de la hemolisina en la ruptura de las vacuolas que contienen al parásito, permitiendo de esta forma su escape al citoplasma [Mellman y col., 1986; Anderson y Orci, 1988]. Ejemplos de hemolisinas en patógenos intracelulares se han descrito, por ejemplo, para la bacteria *L. Monocytogenes* [Geoffrey y col., 1987; Bernheimer y col., 1986]. Se trata de una toxina activada por sulfhidrilo y dependiente de pH que es esencial para la proliferación intracelular de la bacteria [Portnoy y col., 1988]. No parece ser el caso de la hemolisina de *T. cruzi*, que no es activada por sulfhidrilo, ya que no puede ser inhibida por iodoacetamida.

La hemolisis producida por *T. cruzi* indica que, de algún modo, se produce un daño a la integridad de la membrana de eritrocitos. El sistema del complemento origina lesiones que conducen a la lisis osmótica coloidal, en la que todos los constituyentes intracelulares son liberados independientemente de sus tamaños. Bajo estas circunstancias, el canal sólo tiene que ser lo suficientemente grande como para permitir que cationes tales como sodio pasen para causar el influjo de agua y la explosión del eritrocito. Experimentos con fantasmas de



eritrocitos, en los que no ocurre lisis osmótica coloidal, ya que no contienen altas concentraciones de macromoléculas capaces de generar diferencias de presión osmótica a través de la membrana plasmática, indicaron que la hemolisina forma lesiones en las membranas diana que permiten el paso de moléculas de dextrano de un diámetro molecular estimado de 10 nm [Andrews y Whitlow, 1989]. Solamente la población de moléculas de dextrano fue liberada, mientras que las más grandes fueron retenidas en el interior de los fantasmas, concluyendo que la lisis se debe principalmente a canales transmembrana y no a la desintegración de la membrana por moléculas como detergentes o fosfolipasas.

La presencia de actividad citotóxica en los sobrenadantes de *T. cruzi* respecto a células nucleadas [Andrews y col., 1990], junto con la observación de las grandes lesiones formadas sobre las células diana [Andrews y Whitlow, 1989], sugieren una posible analogía entre el mecanismo de acción de la hemolisina de *T. cruzi* y los complejos de ataque a la membrana por el complemento [Podack y col., 1982]. Sobrenadantes de amastigotes de *T. cruzi*, contienen una proteína de 75 Kda que comigra con la perforina de ratón y con C9 humano en un gel SDS-PAGE, bajo condiciones reducidas. Cuando no están reducidas, la proteína de *T. cruzi* (Tc-TOX) migra más rápido, con una masa aparente de 60 Kda [Andrews y col., 1990]. Tc-TOX y la perforina de ratón fueron reconocidos por anticuerpos frente a C9 humano reducido y alquilado. Cuando se realizaron inmunoblots con anticuerpos frente a C9 nativo sobre sobrenadantes de *T. cruzi* concentrados no se observó reacción alguna. La adición de inhibidores metabólicos como azida sódica o 2-deoxiglucosa al tampón de incubación inhibe la producción de Tc-TOX. Los tres estadios del parásito son resistentes a la acción de la perforina purificada, en dosis 100 veces superiores a las necesarias para matar células tumorales susceptibles. Por otro lado, macrófagos infectados fueron fácilmente destruidos mientras que los amastigotes intracelulares permanecieron intactos [Bisaggio y col., 1997]. Los tripomastigotes también son resistentes al efecto lítico del complemento, contribuyendo a la supervivencia del parásito en el torrente sanguíneo.

En nuestro laboratorio se ha descrito la actividad de una nueva molécula implicada en el proceso infeccioso de *T. cruzi*. El gen correspondiente se aisló a partir del reconocimiento en una librería de expresión de amastigotes por anticuerpos dirigidos frente al componente C9 del complemento humano. La proteína correspondiente, de 552 aminoácidos, presentó reacción inmunológica cruzada con los anticuerpos anteriores y con anticuerpos dirigidos frente a TcTOX. La sustitución génica de LYT1 en parásitos salvajes con la obtención de



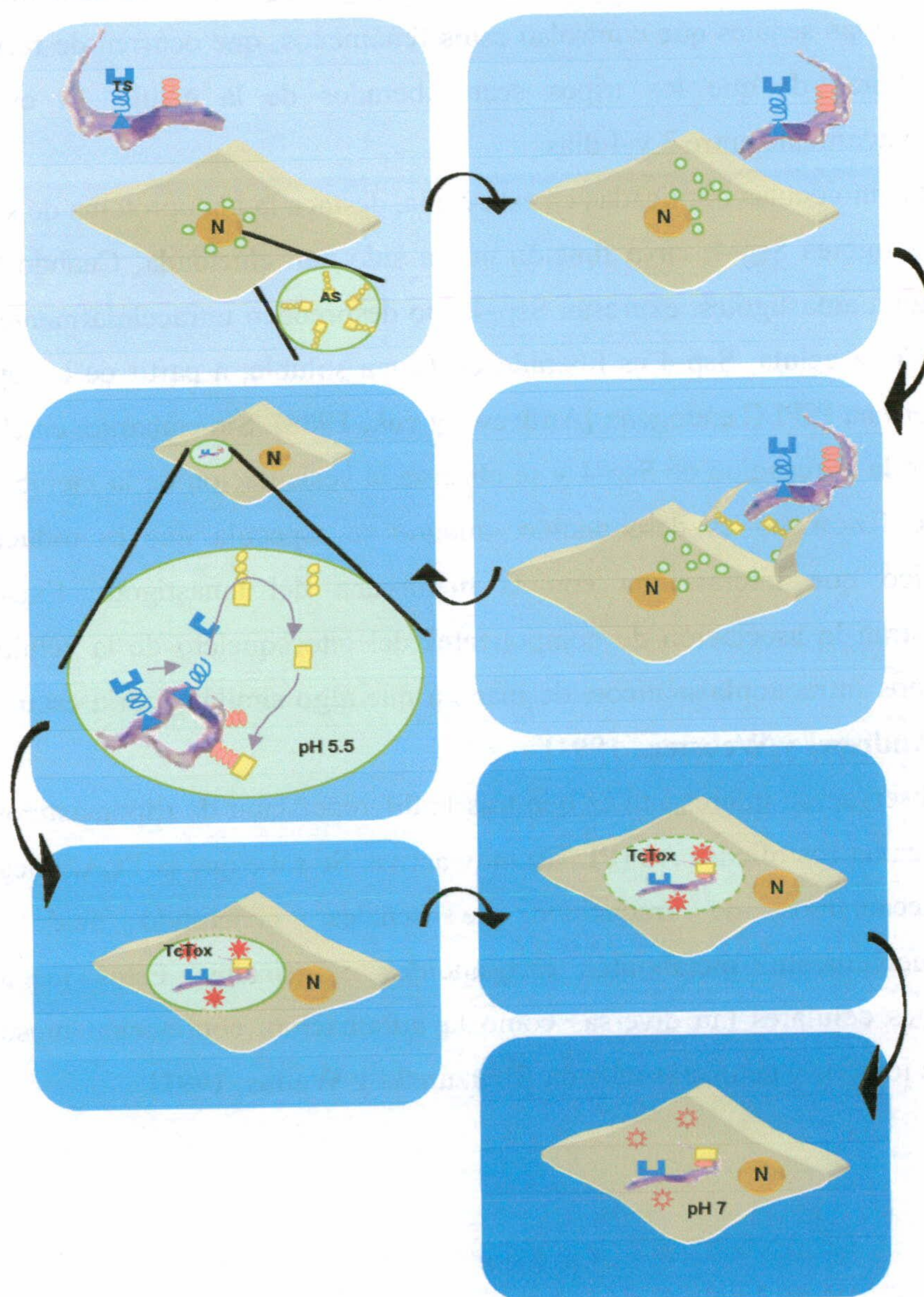
mutantes nulos, permitió estudiar la implicación de este elemento en el ciclo infectivo del parásito. Así, se observó que los mutantes nulos presentaban actividad hemolítica disminuida y daban lugar a infecciones deficientes. Considerando la reactividad inmunológica, la implicación en hemólisis, y el que la actividad de la proteína fuese óptima a pH ácido, hizo pensar que LYT1 estaba implicada, junto a TcTOX, en la ruptura de la vacuola fagolisosómica [Cortés, A., tesis doctoral, 1998].

Otra de las proteínas implicadas en la salida del parásito al citosol es una proteína de superficie de la forma tripomastigote: la transialidasa que pertenece a una amplia familia de glicoproteínas de superficie de *T. cruzi* y que es capaz de transferir entre 2 y 3 residuos de ácido siálico desde donantes externos (glicoproteínas séricas o de la membrana de la célula huésped), a aceptores terminales de galactosa que se hallan sobre la superficie de los tripomastigotes y viceversa [Hall y col., 1992; Schenkman y col., 1994; Schenkman y Eichinger., 1993]. Las glicoproteínas lisosomales (LGPs) se hallan fuertemente sializadas y constituyen el 50% del contenido total de proteínas de los lisosomas de mamíferos [Kornfeld y Mellman, 1989]. Están presentes en alta densidad en la cara luminal de la vacuola. Por lo tanto, las LGPs deben encontrarse entre las primeras proteínas del hospedador que el parásito encuentra durante su travesía en el interior celular. Teniendo en cuenta la doble actividad enzimática: neuraminidasa y transialidasa, bajo condiciones ácidas, podría ocurrir una transferencia de residuos de ácido siálico desde las LGPs hasta la superficie del parásito durante el proceso de invasión, cuando los lisosomas son reclutados y fusionados con la vacuola. El escape del parásito de la vacuola ocurre de forma significativamente más rápida en células deficientes en glicoproteínas sializadas, y se ha demostrado que la actividad lítica de la hemolisina de *T. cruzi* es mayor cuando ocurre una desialización previa de las células diana [Hall y col., 1992].

Estos resultados sugieren que el ácido siálico podría constituir una barrera para la formación de poros y la ruptura de la vacuola, y que una de las funciones de las transialidasas de superficie de los tripomastigotes podría ser vencer esa resistencia. Interesantemente, la transialidasa de la superficie del parásito es liberada de forma mayoritaria cuando el medio se acidifica. Teniendo en cuenta que el parásito se encuentra en un compartimento ácido tan pronto como entra en la célula, es concebible pensar que el incremento en la liberación de la transialidasa soluble a bajo pH contribuya a incrementar la concentración local de la enzima, resultando en la desialización de las LGPs [Hall y col., 1992]. Por lo tanto, la hipótesis



resultante a la vista de estos datos es que la actividad transialidasa podría incrementar la eficiencia de la lisis de la membrana de la vacuola parasitófora al favorecer la actividad lítica de Tc-TOX y LYT1, y, simultáneamente, proteger al parásito de la lisis al crear sobre su superficie una barrera de protección constituida por los residuos de ácido siálico transferidos [Hall y col., 1992]. En el citosol, ambas moléculas se inactivarían y el parásito comenzaría a replicarse, tras previa transformación al estadio amastigote.



**Figura II.22.- Escape del parásito al citosol.** Esquema que representa la participación de la transialidasa de superficie del parásito (TS), los residuos de ácido siálico (AS) de las glicoproteínas de los lisosomas de la célula huésped, y la actividad hemolítica de TcTOX



#### II.4.4 Etapa citosólica

Cuando el parásito llega al citoplasma, entra en contacto con un medio diferente en el que los amastigotes van a permanecer en un estado de latencia durante un periodo *lag* de aproximadamente 24 horas, tras el cual se disparará la replicación. En este medio se produce también la diferenciación de amastigotes a tripomastigotes. Prácticamente no se conoce nada acerca de las señales que controlan estos fenómenos, que ocurren de forma sincrónica unas pocas horas de que los tripomastigotes sean liberados de la célula. El ciclo completo dura aproximadamente entre 3 y 4 días.

Entre las moléculas implicadas en esta etapa, destaca la glicoproteína de superficie específica de amastigotes Ssp-4, cuya función no ha sido aún elucidada. Cuando los tripomastigotes cambian a amastigotes, expresan Ssp-4 y lo desprenden intracelularmente de forma gradual. Fuera de la célula, Ssp-4 es liberado en forma soluble, a partir de la ruptura de su anclaje GPI por una PIPLC endógena [Andrews y col., 1988]. Sin embargo, en el interior celular, se produce la agregación de Ssp-4 y se observa la vesiculación de la membrana. El significado de este fenómeno es desconocido, aunque se especula que es inducido por un factor citosólico que interacciona con la membrana del amastigote. Existen ejemplos que demuestran la asociación de componentes del citoesqueleto de la célula hospedadora con patógenos intracitoplasmáticos, de manera que algo similar podría estar ocurriendo en este caso [Andrews y Webster., 1991].

Otra observación interesante es que tras la diferenciación de tripomastigote a amastigote, se produce una fosfolipasa A2 (PLA2) muy activa. Se sabe que la PLA2 juega un papel central en mecanismos de traducción de señales, generando ácido araquidónico y, subsecuentemente, metabolitos eicosanoides oxigenados. Estos metabolitos gobiernan funciones celulares tan diversas como la inflamación, contracción muscular, actividad de canales iónicos y neurotransmisión [Pruzanski y Wadas, 1991]



## **II.5 PROTEÍNAS FORMADORAS DE POROS**

Las moléculas capaces de formar poros en las membranas biológicas han sido seleccionadas evolutivamente en procariotas y eucariota en base al balance establecido entre permeabilización y efecto lítico [Amino y col., 2002]. Péptidos citolíticos tales como las defensinas, actinoporinas, melitina, etc, se hallan ubicuamente distribuidos entre mamíferos, anfibios, insectos y hongos, actuando como elementos ofensivos o defensivos que alterna las propiedades de barrera de las membranas de las células diana [Matsuzaki y col., 1995]. Se han propuesto dos teorías principales para explicar el mecanismo de acción de estas moléculas: que actúen intercalándose en la bicapa lipídica con un efecto detergente, o bien que formen un canal por agregación de moléculas en la bicapa [Mancheño y col., 1996].

En cuanto a los organismos unicelulares con un modo de vida parasitaria, éstos deben hacer frente, a los mecanismos de respuesta inmune del hospedador en que se hallan desarrollando su ciclo de vida. Uno de los mecanismos más explotados consiste en residir en el interior de las células hospedadoras. Para ello deben introducirse y mantenerse en la célula con el mínimo trauma para la misma, de modo que se mantenga un ambiente que permita su replicación y que no pueda desencadenar una respuesta inmune letal contra el parásito.

Las estrategias desarrolladas por los microorganismos para tener éxito en su modo de vida son diferentes. Con la excepción de los bdellovibrios y microsporidias, que invaden las células por penetración directa, los parásitos intracelulares intentan mantener la continuidad estructural de la membrana de la células hospedadora intacta durante el proceso de entrada a la misma, resultando en la formación de un fagosoma unido a la membrana. A continuación pueden desarrollarse de forma intrafagosomal, intrafagolisosomal, o intracitosólico. En el último caso, el acceso al citoplasma ocurre tras la ruptura de la membrana vacuolar. En este proceso intervienen, entre otros factores, las llamadas proteínas formadoras de poros (PFPs), producidas por algunos parásitos durante su ciclo de vida.

El mecanismo de acción general de PFPs consiste en crear lesiones inespecíficas en la membrana que perturban la barrera de permeabilidad celular generando una vía de entrada libre para iones y otros sustratos a través de la membrana de la célula. Como consecuencia de la alteración de la permeabilidad celular y consiguiente movimiento anárquico transmembrana, el potencial electroquímico de la célula se altera produciéndose una difusión de agua que finaliza en la destrucción celular [Ojcius y Young., 1990]. El mecanismo de





acción de las PFPs es distinto del de otros agentes capaces de degradar o alterar los componentes estructurales de las membranas, como fosfolipasas o ciertas enzimas, o del de detergentes, que, por intercalación en la bicapa lipídica, puedan llegar a disolver físicamente la membrana. La estrategia de insertar poros en la membrana de una célula diana es un mecanismo general de daño celular, que es utilizado por el complemento, linfocitos citotóxicos, y muchos parásitos. De este modo, las PFPs pasan a tener carácter de elemento responsable de la virulencia del proceso infeccioso de los mismos. Parásitos extracelulares podrían lisar directamente la célula diana, mientras que puede que los intracelulares las utilicen para escapar desde los fagosomas al citosol.

En la tabla siguiente se muestran PFPs que interactúan y/o dañan a células hospedadoras, producidas por microorganismos patógenos intracelulares, agrupados según su localización, y algunos extracelulares.

Patógeno	Citolisina	Propiedades	Referencia
<b>Patógenos intracelulares</b>			
<i>Destino intrafagosomal</i>			
<i>Legionella pneumophila</i>	Legiolisina	Hemolisis	Rdest y col., 1991 Gao y Kwaik., 2000
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hemolisina de contacto	Hemolisis Citólisis	King y col., 1993
<i>Salmonella typhimurium</i>	Salmolisina	Hemolisis Citólisis	Libby y col., 1994 Achouak y col., 2001
<b>Patógenos intracelulares</b>			
<i>Destino intrafagosomal</i>			
<i>Leishmania amazonensis</i>	Leishporina	Hemolisis Reacción cruzada con C9 Actividad óptima a pH ácido	Norohna y col., 1994
<b>Patógenos intracelulares</b>			
<i>Destino citosólico</i>			
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Fosfolipasa A	Citólisis	Winkler, 1990
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriolisina O	Activada por sulfidrilos Formación de poros Actividad óptima a pH ácido	Portnoy y col., 1992 Bielecki y col., 1990
<i>Shigella flexneri</i>	Hemolisina de contacto	Hemolisis	Sansonetti y col., 1986
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tc-TOX	Hemolisis Citólisis Reacción cruzada con C9 Actividad óptima a pH ácido	Andrews y col., 1990
<b>Patógenos extracelulares</b>			
<i>Escherichia coli</i>	HlyA	Citólisis	Hacker y col., 1988 Bhakdi y col., 1986 Ropele y Menestrina, 1989 Achouak y col., 2001
<i>Naegleria fowleri</i>	N-PFP	Citólisis	Ravdin y col., 1982 Young y Lowry., 1989
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebaporos A, B, y C	Citólisis	Young y col., 1982 Leippe y col., 1991

Figura II.24.- Descripción de las principales proteínas formadoras de poros en diferentes organismos patógeno.



Actualmente se conoce que ciertas bacterias Gram-negativas pueden causar enfermedades vía PFPs. Por ejemplo, *Escherichia coli* posee cepas virulentas que pueden causar neumonía, meningitis e infecciones del tracto urinario. Parece que la mitad de las *E. coli* patógenas poseen actividad hemolítica, siendo esta actividad suprimida en las cepas que muestran el fenotipo no virulento [Hacker y col., 1988]. La actividad lítica de *E. coli* se asocia a una PFP de 107 Kda (Hly A), que produce canales iónicos de unos 3nm de diámetro al insertarse en la membrana de la célula diana [Bhakdi y col., 1988; Ropele y Menestrina., 1989], e induce la ruptura nuclear al expresarse en mutantes de *Shigella flexneri* ipa- [Zichilinsky, 1994]. Parece que la PFP de *E. coli* se halla relacionada estructural y funcionalmente con las producidas por otras bacterias Gram-negativas como *Morganella morganii*, *Bordetella pertussis*, y *Pasteurella haemolytica* [Koronakis y col., 1987; Lo y col., 1987; Glaser y col., 1988]. *Campilobacter jejuni* es otra bacteria gram negativa que presenta una proteína, MOMP, a la que se le atribuyen funciones relacionadas con la organización estructural de la membrana externa, de adhesión a células en cultivo, y actividad formadora de poros [Huyer y col., 1986; Amako y col., 1996; Schröder y Moser., 1997]. Su organización estructural en la membrana ha permitido hipotetizar que la trimerización de porinas nativas en la membrana externa de bacterias gram negativas podría ser un paso necesario para proteger las unidades monoméricas de la degradación y para organizar las propiedades de carga de la membrana [Dé y col., 2000].

Entre los parásitos extracelulares que utilizan PFPs en sus mecanismos para lisar una amplia variedad de células, se encuentran *Entamoeba histolytica* (E-PFP) y *Naegleria fowleri* (N-PFP) [Ravdin y Guerrant, 1982; Warhurst, 1985]. PFPs de ambos organismos han sido purificadas y caracterizadas [Lynch y col., 1982; Youngy col., 1982; Lowrey y McLaughlin., 1984; Young y Cohn., 1985; Keller y col., 1988; Keller y col., 1989; Young y Lowrey, 1989]. En *E. histolytica*, tres PFPs (amebaporos A, B y C) se han aislado de los gránulos citoplasmáticos, con una masa molecular de 8 Kda, e importantes diferencias en su estructura primaria. La N-PFP tiene una masa molecular de 66 y 50-54 kda, según se consideren condiciones reducidas y no reducidas, respectivamente [Horta, 1997]. Los poros producidos por ésta son mucho mayores que los producidos por los amebaporos. La N-PFP unida a membrana es termorresistente, lo que ha hecho posible determinar la participación de la misma en la histolisis total mediada por lisados libres de células de *N. fowleri* [Lowrey y McLaughlin., 1985; Young y Lowrey., 1989;]. Estas dos PFPs no presentan ningún tipo de



reactividad cruzada y son estructural y funcionalmente diferentes aunque realicen una función similar.

Los parásitos intracelulares se tienen que enfrentar a una situación diferente, debiendo romper la membrana vacuolar y/o la plasmática de la célula hospedadora en algún momento de sus ciclos celulares para poder desarrollar con éxito su ciclo de vida. De forma general, los parásitos deben escapar rápidamente de la vacuola para evitar la muerte por acidificación, fusión lisosomal, u otros mecanismos de respuesta inmune.

Las PFPs de, al menos, dos patógenos intracelulares se han asociado a la patogenicidad de los mismos. Se trata de la bacteria Gram-positiva *Listeria monocytogenes* y el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Mientras que *E. histolytica* y *N. fowleri* lisan y luego fagocitan a sus células dianas, estos patógenos intracelulares han desarrollado mecanismos que les permiten utilizar las células del hospedador [Ojcius y Young., 1990]. Las vías de acceso al interior de las células son distintos según se trate de células fagocíticas profesionales o no fagocíticas. Pero en ambos casos, los parásitos deben usar mecanismos que les permitan sobrevivir en el interior de la célula hospedadora. Mediante las respectivas PFPs, tanto *L.monocytogenes* como *T. cruzi*, parecen haber encontrado la forma de escapar del ambiente hostil del fagosoma.

La citolisina mejor caracterizada que actúa intracelularmente es la PFP de *L. monocytogenes*, denominada listeriolisina O (LLO). Ésta pertenece a una familia de citolisinas activadas por sulfhidrilo, que están presentes en 19 especies diferentes de bacterias Gram-positiva, siendo el único miembro de la familia de toxinas activadas por sulfhidrilo de las bacterias Gram-positivas con actividad óptima a pH ácido. *L. monocytogenes* puede proliferar en fagocitos no profesionales, células epiteliales y fibroblastos, así como en células de la línea fagocítica mononuclear [Gaillard y col., 1987; Portnoy y col., 1988]. La entrada en fagocitos no profesionales es inducida por la propia bacteria, como lo demuestra el que puede ser bloqueada por citocalasina D y, en los estadios tempranos de la infección, se localiza en membranas fagocíticas unidas a la membrana de la célula hospedadora. Poco después de la invasión, la bacteria induce la lisis del fagosoma y crece libre en el citoplasma. Cuando se observan mutantes LLO-, que no pueden escapar al citoplasma, se sugiere que la formación de poros transmembrana es el evento que conduce a la ruptura de la vacuola. Cuando se utilizó *Bacillus subtilis* para expresar LLO, éste adquirió la capacidad de escapar del fagosoma y crecer en el citoplasma de macrófagos, lo que demostró claramente la función de



LLO. Recientemente se está investigando la posibilidad de usar LLO y otras PFPs en procesos de permeabilización que permitan la liberación de drogas específicas al citosol en células diana, evitando su salida o efecto sobre otras células circundantes [Provoda y Lee., 2000].

En el caso de *Trypanosoma cruzi*, Andrews y col., en 1989, describieron la secreción por parte del parásito de una hemolisina activa a pH ácido. Posteriormente, llevaron a cabo la purificación de una actividad proteica de *T. cruzi* relacionada antigénicamente con C9. La hemolisina de *T. cruzi* copurifica como una proteína de 60 a 75 Kda y las fracciones enriquecidas en esa proteína forman canales iónicos en bicapas de fosfolípidos planares a bajo pH [Andrews y col., 1990]. En nuestro laboratorio se ha descrito otra proteína, LYT1, de este parásito que parece formar parte de la ruta lítica que le permite la ruptura de la vacuola fagolisosómica y la salida al citosol [Cortés, A., tesis doctoral., 1998].

Un comportamiento funcionalmente similar presentan *Theileria parva* y *Babesia bovis*, que se localizan en el citosol al poco de invadir la célula hospedadora, donde se reproducen. Tras el proceso de invasión, en el que están implicadas actividades enzimáticas como proteasas [Schrevel y col., 1990] y fosfolipasas [Schwartzman y col., 1992], estos parásitos quedan rodeados por una membrana que, aunque es continuidad de la membrana plasmática de la célula hospedadora, presenta una estructura diferente, lo que parece indicar que la contribución de la célula a la membrana de la vacuola se restringe a los lípidos presentes en ella. Una vez que se completa la formación de la vacuola, se inicia una etapa de maduración de ésta que refleja los intercambios metabólicos que ocurren entre el parásito y la célula hospedadora [Entzeroth y col., 1986; Aikawa y col., 1990; Achbarou y col., 1991]

Para que ocurra la proliferación intracelular de *Shigella flexneri*, *Rickettsia tsutsugamushi* y *R. powazeki*, debe producirse la lisis de la membrana fagolisosomal que los rodea respectivamente. En los tres casos los mecanismos de entrada a la célula y de escape de la vacuola son similares [Walker y Winkler., 1978; Rikihisa e Ito., 1979; Sansonetti y col., 1986]. En el caso de *S. flexneri* se ha caracterizado una fosfolipasa A como responsable de la actividad hemolítica y de los efectos citotóxicos observados in vitro. Parece posible que una fosfolipasa sea responsable del mecanismo de escape en los otros casos.

Sin embargo, no todas las PFPs de patógenos intracelulares tienen como función la ruptura de la membrana vacuolas. *Salmonella typhimurium* es un patógeno intracelular facultativo que posee una citolisina (slyA) que parece participar en la virulencia y supervivencia del



parásito en macrófagos, aunque permanezca en el interior del fagosoma después de entrar en la célula. Si *slyA* es esencial para la supervivencia intracelular, ésta debe de tener una función no relacionada con la ruptura vacuolar. El gen *slyA*, presente también en *Shigella* y *E. coli*, codifica una proteína de 16 Kda cuya secuencia aparentemente no posee homología con ninguna otra citolisina formadora de poros ni con ninguna otra proteína [Andrews y Portnoy., 1994b]. Este mismo razonamiento se podría aplicar a otros patógenos intracelulares que producen citolisinas, como es el caso de *Mycobacterium* [King y col., 1993] y *Legionella* [Rdest y col., 1991].

Por otro lado, en algunos casos parece que se forman poros transmembrana pero no en suficiente densidad como para inducir la ruptura de la membrana vacuolar. Cuando *B. subtilis* expresa streptolisina O (SLO) no escapa de la vacuola, presumiblemente porque la actividad específica de SLO es menor que la de LLO [Portnoy y col., 1992]. Un factor importante a tener en cuenta sobre el efecto de las PFPs y el destino de la vacuola es su volumen: *Salmonella* reside, al menos inicialmente, en fagosomas espaciosos [Alpuche Aranda y col., 1994], mientras que *T. cruzi* está fuertemente rodeado por membranas, lo que favorecería la lisis por PFPs.

En el caso del tripanosomátido *Leishmania amazonensis*, tanto amastigotes como promastigotes poseen una PFP activa a pH ácido que presenta reacción inmunológica cruzada con C9 [Norohna y col., 1994]. La leishporina se encuentra localizada en el interior de vesículas membranosas de forma soluble [Norohna y col., 1996]. A diferencia de todos los casos comentados hasta el momento, en los que el desarrollo del ciclo de vida del correspondiente parásito pasa por el escape del mismo al citosol de la célula hospedadora, *Leishmania* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en el interior de un fagosoma con un rango de pH entre 4.7 y 5.2. Sin embargo, posteriormente deben romper tanto la membrana vacuolar como la plasmática, y liberar a los amastigotes que infectarán otras células.. La actividad lítica es óptima a 37°C y a pH 5.5, aunque también presenta actividad a pH 7.0 (pH del interior de la vacuola) y a 25°C (temperatura corporal del hospedador invertebrado), por lo que se ha postulado que intervenga también en el proceso de internalización del parásito jugando un papel activo facilitando la entrada por alteración de la permeabilidad de la membrana, y que intervenga en la obtención de nutrientes desde la hemoglobina, lisando eritrocitos del insecto [Norohna y col., 2000]. Investigaciones recientes han permitido hipotetizar sobre los mecanismos de activación de leishporinas: puede que existan de forma



inactiva necesitando un proceso de proteólisis para la activación o puede que se hallen unidas a inhibidores que deben ser eliminados para que la leishporina sea activa [Almeida-Campos y Horta., 2000].

Otro caso interesante es el de *Toxoplasma gondii*, que invade la célula hospedadora por un proceso activo que implica la formación de una vacuola derivada de la membrana plasmática del hospedador. En este parásito no se han descrito PFPs. En realidad, *T. gondii* forma dos vacuolas morfológica, funcional e inmunológicamente diferentes. En la primera de ellas no ocurre la replicación del parásito, ya que éste no puede acceder a los nutrientes de la célula hospedadora [Tilley y col., 1997]. El destino intracelular de las vacuolas que contienen al parásito dependen del tiempo de formación y del mecanismo de entrada. Parece ser que *T. gondii* evade el procesamiento endocítico debido a una alteración de la función de proteínas reguladoras del hospedador necesarias para dirigir la fusión endocítica, que diferirá con lo que normalmente ocurre en la formación de una vacuola primaria [Mordue y Sibley., 1997].



## **II.6 APÉNDICE I: GENERACIÓN DE MUTANTES NULOS PARA EL GEN *LYT1***

Debido a que no se encontró homología alguna con todas las bases de datos estudiadas, el único punto de partida que señalaba hacia una posible función de esta proteína se basaba en la evidencia circunstancial de que *LYT1* pudiera estar relacionada, al menos funcionalmente, con Tc-TOX, una actividad hemolítica secretada. Esta evidencia se sustentaba en el hecho de que *LYT1* presentaba una putativa secuencia señal en su extremo amino terminal, sugiriendo el hecho de que pudiera ser secretada. Queriendo conocer el posible papel del producto del gen *LYT1*, se desarrolló una estrategia genética basada en la sustitución alélica de uno o los dos alelos del gen en la cepa CI Brener con objeto de estudiar el posible papel del producto génico.

Se diseñaron dos plásmidos que contenían el gen de la neomicina fosfotransferasa II o el de la higromicina fosfotransferasa B, que conferían resistencia a G418 y la higromicina B, respectivamente, y que estaban ligados a las regiones 3' y 5' flanqueantes del gen *LYT1*. La sustitución génica se llevó a cabo en el loci del tipo salvaje por recombinación homóloga. Usando esta metodología genética se observó que *LYT1* no se requería para la viabilidad de los epimastigotes, pero que los parásitos deficientes en el gen mostraban fenotipos diferentes. Estos parásitos presentaban reducida infectividad y actividad hemolítica disminuida, cuando se comparaban con los parásitos salvajes.



# Objetivos





### III OBJETIVOS

La proteína LYT1, presente en el protozoo parásito *T. cruzi*, ha sido implicada en el proceso infeccioso del mismo debido a la observación de fenotipos deficientes tanto en las invasiones sobre células susceptibles como en la actividad hemolítica asociada, que son producidos por los mutantes nulos para el gen. La actividad de esta proteína en el contexto de la biología del parásito, incluyendo ciclo de desarrollo y proceso infeccioso, son los objetivos principales que se han estudiado en el trabajo de investigación que comprende esta tesis doctoral. Asimismo, se ha profundizado en su caracterización genética, lo que ha aportado importantes descubrimientos acerca del control de la expresión llevado a cabo por estos organismos. A partir de todos los datos conocidos sobre la caracterización anterior de *LYT1*, se desarrolló un plan de trabajo con la intención de concretar y profundizar más en los aspectos moleculares y celulares en los que *LYT1* pudiera estar implicado.

#### 1 Caracterización molecular del gen *LYT1*:

*1.a Clonaje de los alelos LYT1a y LYT1b. Determinación de posibles diferencias alélicas.*

*1.b Caracterización de los procesos de transcripción y procesamiento del gen.*

*1.c Análisis del proceso de "splicing" alternativo.*

#### 2 Expresión y purificación de construcciones específicas de *LYT1* recombinante. Obtención de anticuerpos policlonales.

#### 3 Reconstitución diferencial de los mutantes nulos

*3.a Construcción de los vectores de expresión con las formas derivadas del gen LYT1*

#### 4 Expresión de *LYT1* en los sistemas biológicos *Leishmania tropica* y *Phytomonas serpens*

#### 5 Caracterización biológica del gen *LYT1* en los distintos sistemas de expresión (*T. cruzi*, *L. tropica* y *P. Serpens*)

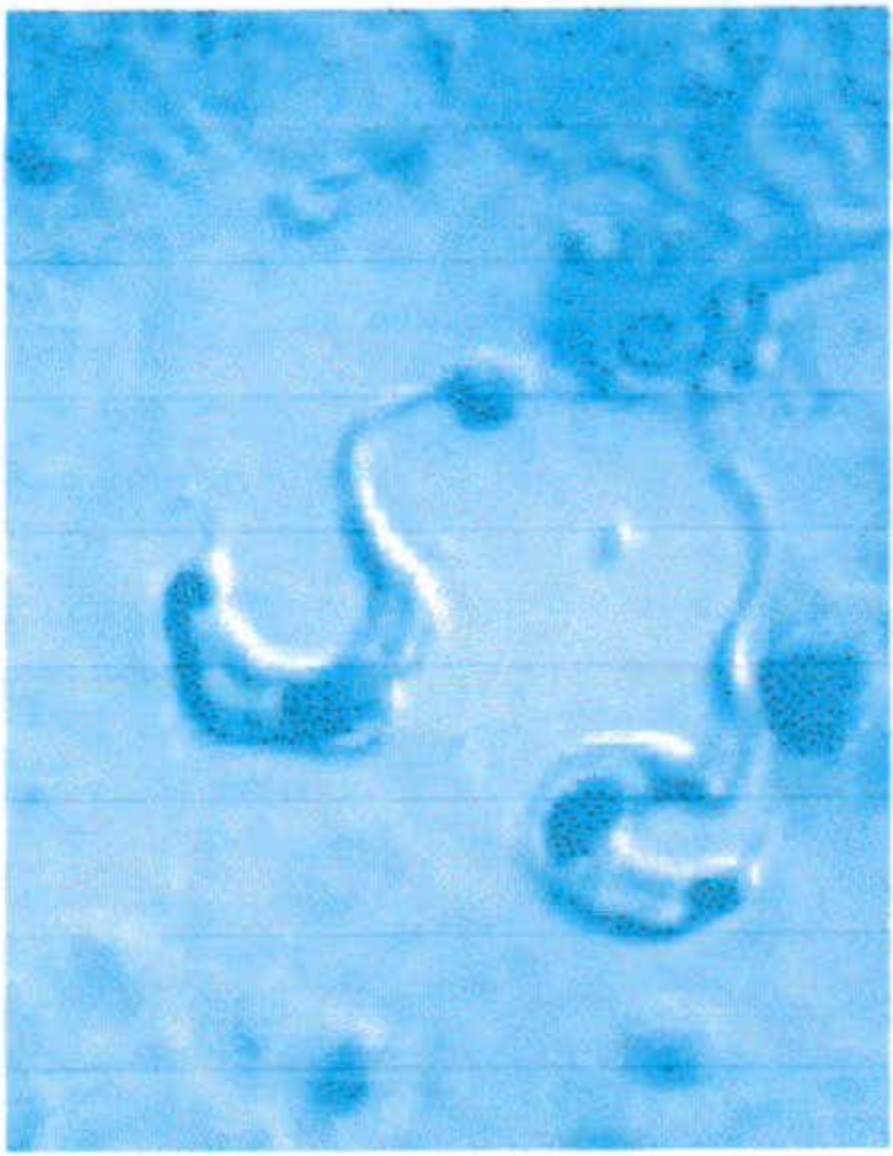
*4.a Inmunolocalización de la proteína nativa en el parásito*

*4.b Observación de las infecciones secundarias.*

*4.c Participación de LYT1 en los acontecimientos intracelulares en la infección a corto plazo*

*4.d Caracterización de la actividad lítica*

*4.e Observación del proceso de cambio de estadio in vitro*



# Material y métodos



## IV MATERIAL Y MÉTODOS

### IV.1 MATERIAL

#### IV.1.1 Líneas celulares

➤ **Parásitos:**

- ❑ *Trypanosoma cruzi*: cepa C1 (clon C1 Brener, Zingales y col., 1995).
- ❑ *Leishmania tropica*: cepa LRC-L39
- ❑ *Phytomonas serpens* cepa T10

➤ **Células de mamífero:**

- ❑ Células LLC-MK2: células de la línea epitelial del riñón de simio
- ❑ Células VERO: fibroblastos del riñón del mono verde africano.
- ❑ Células 3T3NIH: fibroblastos de embrión de ratón
- ❑ Células NRK: fibroblastos del riñón de rata
- ❑ Macrófagos de la cepa J774: macrófagos de ratón cepa BALB/c
- ❑ Glóbulos rojos de sangre de conejo: cepa New Zealand...

➤ **Cepas bacterianas:**

- ❑ XL1-Blue *E.coli*: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, sup E44, relA1, lac, (F'proAB, lacI<sup>q</sup>, ZAM15, Tn10 (tet<sup>r</sup>)).
- ❑ BL21 (DE3) *E.coli*: B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-)gal λ(DE3).

#### IV.1.2 Medios de cultivo



Los medios de cultivo y suero bovino fetal se obtuvieron principalmente de las casas comerciales DIFCO y GIBCO. Los medios utilizados tanto para parásitos como líneas celulares, fueron enriquecidos, según los casos, con un 10% (DMEM, LIT, M199, RPMI), 5% (medio GRACE) o un 2% (DMEM) de suero bovino fetal (SBF), previamente inactivado.

➤ **Medios para bacterias:**

- ❑ Medio LB (Luria Bertani) líquido: Bactotripton 10 gr, extracto de levadura 5 g, ClNa 10gr, agua destilada hasta 1 l, pH ajustado a 7.2 con NaOH.
- ❑ Medio LB-agar: LB líquido y agar al 1.5% (p/v)
- ❑ Medio SOC: 0.5% extracto de levadura, 2% tripton, 100mM ClNa, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM SO<sub>4</sub>, 20 mM glucosa.

➤ **Medios para células:**

- ❑ Medio DMEM: se usa suplementado con 10% de SBFi y 1mM de glutamina. pH ajustado a 7.2
- ❑ Medio RPMI: suplementado con 10% de SBFi y 2 mM de glutamina, pH ajustado a 7.2
- ❑ Medio RPMI + AB: suplementado con 10% de SBFi y 2 mM de glutamina, pH ajustado a 7.2

➤ **Medios para parásitos:**

- ❑ Medio LIT: ClNa 43 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, D-glucosa 11 mM, Infusión de hígado 5 gr, triptosa 5 gr suplementado con 25 mg/l de medio de Hemina (Sigma) y con 10% SBFi, pH ajustado a 7.2.
- ❑ Medio Grace's (para cultivo de *T. cruzi*): suministrado por Gibco BRL, carente de hemolinfa de insecto, suplementado con HCO<sub>3</sub>Na y 5% de SBFi, pH ajustado a 6.5.



- Medio Grace's (para cultivo de *Phytomonas sp*): suministrado por Gibco BRL, se prepara según las instrucciones de la casa comercial, añadiendo  $\text{HCO}_3\text{Na}$ , glucosa 5.5 mM, y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  8 mM. Se suplementa con 10% SBFi, pH ajustado a 6.3
- Medio 199: suplementado con 10% SBFi, pH ajustado a 7.2
- Medio Ringer's: NaCl 155 mM, KCl 5 mM,  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2 mM, Hepes-Na 10 mM, glucosa 10 mM, BSA (fracción V) 0.5 mg/ml, pH ajustado a 7.2.

Todos los medios para células y parásitos contienen 50U de penicilina (Laboratorios ERN S.A), 100mgr/l de medio de estreptomicina (Laboratorios CEPA S.L), y 40mgr/l de medio de gentamicina (Laboratorios NORMON S.A)

Los medios para selección de bacterias contienen el antibiótico adecuado según los casos: Ampicilina, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Tetraciclina y Kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Proporcionadas por Sigma.

Los medios para selección de parásitos transfectados contienen según la resistencia proporcionada por el plásmido en cuestión y el tipo de parásito: Phleomycina (550  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para *T. cruzi*, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para *Phytomonas*), G418 (a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el caso de *Leishmania tropica*); ambas de Sigma

#### IV.1.3 Productos químicos

Las casas comerciales encargadas de suministrar los diferentes compuestos químicos fueron: Boehringer Mannheim, Merck, Sigma, Promega, New England Biolabs, Pharmacia, Stratagene, BioRad, Fluka, Panreac, Riedel de Haën, Molecular Probes, Research Diagnostics (RDI), Difco.

#### IV.1.4 Reactivos para Biología Molecular

- ✓ Enzimas de restricción: Boehringer Mannheim, Promega, Amersham y New England BioLabs.
- ✓ Fosfatasa alcalina, T4 DNA polimerasa, y Taq polimerasa de Boehringer Mannheim.
- ✓ Proteinasa K, RNAasa, DNAsa de Sigma.



- ✓ Se utilizaron los siguientes kits para biología molecular: Wizard Minipreps de Promega, Minipreps y Maxipreps de eppendorf, Gene Clean de BIO 101 Inc
- ✓ Para la electroforesis en geles de agarosa se empleó agarosa Sea-Kem y agarosa de bajo punto de fusión Nusieve de FMS
- ✓ Inhibidores de proteasas suministrados por Sigma: PMSF, Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina.

#### IV.1.5 Tampones y soluciones

Tampón/Soluciones	Composición	Uso
<i>50X Denhardt's</i>	BSA 1%, Ficoll 400 1%, Polivinilpirrolidona 1%	Soluciones de hibridación
<i>Fenol</i>	Fenol redestilado saturado con agua más Hidroxiquinoleína al 1%	Extracciones de DNA
<i>Fenol-Sevag</i>	Fenol: mezcla Sevag 1:1	Extracciones de DNA
<i>GVB++</i>	Barbital sódico 5 mM, dextrose 2.5%, gelatina 0.1% CaCl <sub>2</sub> 0.15 mM, MgCl <sub>2</sub> 1 mM	Conservación de glóbulos rojos
<i>Mezcla Sevag</i>	Cloroformo:alcohol isoamílico 24:1	Extracciones de DNA
<i>Paraformaldehído</i>	16% paraformaldehído en agua destilada, pH 7.2	Fijación de muestras para observación al microscopio
<i>PBS</i>	ClNa 137 mM, KCl 2.5 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.7 mM	
<i>PBS++</i>	ClNa 137 mM, KCl 2.5 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.7 mM, Cl <sub>2</sub> Ca 1mM, MgCl <sub>2</sub> 0.5 mM	
<i>Solución RNAasas</i>	10U/ml RNAasa T1; 10 µgr/µl RNAasa A	Purificación de DNA
<i>Solución desteñidora de geles de poliacrilamida</i>	10% ácido acético, 10% metanol	Geles de proteínas
<i>Solución teñidora de geles de poliacrilamida</i>	2.5% Coomassie Blue R-250 en solución desteñidora	Geles de proteínas
<i>Solución HBS</i>	Hepes 21 mM, ClNa 137 mM, KCl 5 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.7 mM, glucosa 6 mM, pH 7.4	Tampón de lavado para electroporación de parásitos
<i>SSC 20X</i>	NaCl 3M, citrato sódico 0.3 M, pH 7.2	Lavados de membranas en procesos de hibridación
<i>TAE 50X</i>	Tris-HCl 2M pH 7.2, EDTA 50 mM, EtBr 1mg/ml	Geles de agarosa
<i>Tampón a pH 7.0</i>	Tris HCl 10 mM pH 7.0, NaCl 150 mM, D-glucosa 0.1%	Obtención de sobrenadantes Ensayos hemolíticos



<i>Tampón</i>	<i>Composición</i>	<i>Uso</i>
<i>Tampón a pH 5.5</i>	Acetato sódico 10 mM pH 5.5, NaCl 150 mM, D-glucosa 0.1%	Obtención de sobrenadantes
<i>Tampón de RNAasas</i>	Tris-HCl 25 mM pH 7.4, EDTA 2mM, ClNa 50 mM	Ensayos hemolíticos Purificación del DNA
<i>Tampón de carga de DNA</i>	Glicerol 70% (v/v), sarcosil 5% (p/v), azul de bromofenol 2% (p/v), xilencianol 2% (p/v)	Electroforesis de DNA en geles de agarosa
<i>Tampón de carga(2X) para proteínas</i>	20% glicerol, 5% SDS, 10% $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.004% BPB	SDS-PAGE
<i>Tampón de electroforesis de proteínas</i>	Tris base 25 mM, glicina 0.2 mM, SDS 0.1%	SDS-PAGE
<i>Tampón de revelado de fosfatasa alcalina (AP)</i>	100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>	Western Blot
<i>Tampón de transferencia de proteínas a filtros de nylon (Immobilon P, Millipore)</i>	Metanol 10%, CAPS 0.1 M pH 11	Western Blot
<i>Tampón de extracción</i>	10 mM Tris HCl pH 8.0, 0.1M EDTA pH 8.0, 0.5% SDS	Extracción de DNA genómico
<i>TBE</i>	89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 0.5M EDTA pH 8.0	Electroforesis de DNA en geles de agarosa
<i>TBS</i>	Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM	Preparación de TBST
<i>TBST</i>	TBS, 0.05% Tween 20 (v/v)	Western Blot
<i>TE</i>	EDTA 1mM pH 8.0, Tris-HCl 10 mM,	Resuspensión de DNA
<i>TE-sacarosa</i>	25 mM Tris-HCl pH 8.0, EDTA 10 mM, sacarosa 25mM	Resuspensión de bacterias (minipreps)

#### IV.1.6 Patrones de pesos moleculares para electroforesis

##### ➤ De proteínas:

- Preteñido de amplio rango: Myosina-205 Kd;  $\beta$ -galactosidasa-113 Kd; BSA-75 Kd; Ovoalbumina-53.9 Kd, Anhidrasa carbónica-34.9; Inhibidor de tripsina de soja- 28.8 Kd, lisozima-21 Kd; Aprotinina 7.2 Kd.
- De bajo rango: Fosforilasa B-97.4 Kd; BSA-66.2 Kd; Ovoalbumina-45 Kd; Anhidrasa carbónica-31 Kd; Inhibidor de tripsina de soja-21.5 Kd; lisozima-14.4 Kd



### ➤ De DNA:

- de alto peso molecular: se usaron los fragmentos generados por la digestión completa del DNA del fago  $\lambda$  con HindIII (Promega), de tamaños 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.
- de bajo peso molecular:
  - 1 Kb DNA *ladder* (Gibco): preparado a partir de un plásmido que contiene repeticiones de fragmentos de 1018 pb, de tamaños 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018.
  - 100 bp DNA *ladder* (Gibco): preparado a partir de un plásmido que contiene repeticiones de fragmentos de 100 pb, desde 100 a 1500 pb, y un fragmento adicional de 2072 pb.

#### IV.1.7 Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Longitud(mer)	Aplicación
pGEX 5'	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'	23	Secuenciación
T3	5'-GAATTAACCTCACTAAAGG-3'	20	Secuenciación
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGG-3'	20	Secuenciación
LYT1	5'-CCAGGATCCCGGCCGACGTGC-3'	21	PCRs de LYT1
LYT1tr	5'-CCAGGATCCCGAAGAGA-3'	18	PCRs de LYT1
Artx-1	5'-TGAAAGAGAAGAAAGTC-3'	17	PCRs de LYT1
Artx -5	5'-ATTGGATCCCGGAAGAAAGC-3'	20	PCRs de LYT1
Artx-6	5'-CCCGAATTCTCAGAATG-3'	17	PCRs de LYT1
Artx-8	5'-CGGGATCCATGCGGAAGA-3'	18	PCRs de LYT1
POR4	5'GCAGGATTTGCCAGCGATG-3'	19	PCRs de LYT1 Sonda 5'
EGR-1	5'-GCACCCGCAACCAT-3'	14	PCRs de LYT1
EGR-2	5'-CGTGAAGATGGACTC-3'	15	PCRs de LYT1
TcL1	5'-ACGCGTCGACGAGCCCGAACGATGAACAT-3'	29	PCRs de LYT1/ Secuenciación
TcL2	5'-TTGCTGTTGTTGTTGTTGCC-3'	20	PCRs de LYT1/ Secuenciación
TcL3	5'-GGAAGAAAGCCGCAGCATTAG-3'	21	PCRs de LYT1/ Secuenciación
TcL4	5'-CTAGTCTAGATTTGCGAGCCTCTGCATTTT-3'	30	PCRs de LYT1/ Secuenciación
TcL5	5'-TTCGAACGCCTCGACGCTGA-3'	20	Secuenciación





Nombre	Secuencia	Longitud(mer)	Aplicación
<b>TcL6</b>	<b>5'- GCCGCAGTTGCTGGAGCG-3'</b>	18	<b>Secuenciación</b>
<b>TcL7</b>	<b>5'- AGTGCCTCTAGCTGCCCGT-3'</b>	19	<b>Secuenciación</b>
<b>M13reverse</b>	<b>5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3'</b>	17	<b>Secuenciación</b>
<b>LYT1-2</b>	<b>5'- CGTGCGACTGAGATGTCACC-3'</b>	20	<b>RT-PCR</b>
<b>LYT1-3'</b>	<b>5'ACGTGGATCCCAGTGGCGGAGCAGCACT ATTCGC-3'</b>	34	<b>RT-PCR Sonda 5'</b>
<b>ME 21</b>	<b>5'- GCACTTGGAGGGCGTGGCTGTTT-3'</b>	22	<b>RT-PCR</b>

#### IV.1.8 Vectores y construcciones

Vector	Longitud	Uso y características	Referencia
<b>pGEM-T</b>	3000 pb	Vector de transformación Clonaje/Secuenciación	Promega
<b>pGEX-2T</b>	4900 pb	Vector de expresión	Pharmacia
<b>pCR-Blunt</b>	3500 pb	Vector de transformación. Clonaje/Secuenciación	Invitrogen
<b>pX63NEO</b>	6063 pb	Vector de transfección	Lebowitz y col., 1991
<b>pTEX-ble</b>	5667 pb	Vector de transfección	Nozaki y Cross., 1994
<b>pRIBOTEX</b>	6024 pb	Vector de transfección	Martínez-Calvillo y col., 1997
<b>pGEM5zf(+)<i>LYT15.8</i></b>	5816 pb	Clon genómico.	Manning-Cela y col., 2001
<b>pGEX-2T <i>LYT1</i><math>\delta</math>ss</b>	1686 pb	Transfección de bacterias. Región codificante del gen <i>LYT1</i> sin incluir la secuencia correspondiente a un posible péptido líder (los primeros 45 nucleótidos). Obtenida por PCR a partir del clon genómico con los cebadores <i>LYT1</i> y <i>Artx-6</i> , clonada en <i>Bam</i> H1/ <i>Eco</i> R1 del vector pGEX-2T	Esta tesis
<b>pGEX-2T <i>LYT1</i><math>\alpha</math></b>	865 pb	Transfección de bacterias. Obtención de anticuerpos. Región codificante del gen <i>LYT1</i> correspondiente a la parte carboxiterminal. Obtenida por PCR a partir del clon genómico con los cebadores <i>LYT1</i> tr y <i>Artx-6</i> , clonada en <i>Bam</i> H1/ <i>Eco</i> R1 del vector pGEX-2T	Esta tesis
<b>pCR-Blunt-<i>LYT1</i><math>\alpha</math></b>	2288 pb	Región codificante del alelo <i>LYT1</i> $\alpha$ obtenida por PCR con los cebadores TcL1 y TcL4, clonaje directo del producto de PCR en el vector. Secuenciación	Esta tesis



<i>Vector</i>	<i>Longitud</i>	<i>Uso y características</i>	<i>Referencia</i>
<b><i>pCR-Blunt-LYT1b</i></b>	1992 pb	Región codificante del alelo LYT1b obtenida por PCR con los cebadores TcL1 y TcL4, clonaje directo del producto de PCR en el vector. Secuenciación	Esta tesis
<b><i>pX63NEO LYT1</i></b>	2256 pb	Transfección de <i>L.tropica</i> . Región codificante del gen <i>LYT1</i> , obtenida por PCR con los cebadores Artx8 y Artx1, posterior digestión con <i>BamHI</i> , clonada en el sitio <i>BamHI</i> del vector pX63NEO	Tesis A. Cortés., 1998
<b><i>pRIBOTEX-LYT1</i></b>	1730 pb	Utilizado para la obtención del inserto y clonaje en pTEX- <i>ble</i> . Región codificante completa del gen LYT1 obtenida por PCR a partir del clon genómico con los cebadores Artx-8 y Artx-6, posterior digestión y clonaje en el sitio <i>BamHI/EcoRI</i> del vector.	Esta tesis
<b><i>pRIBOTEX-LYT1<math>\delta</math>atg</i></b>	1727 pb	Utilizado para la obtención del inserto y clonaje en pTEX- <i>ble</i> . Región codificante del gen LYT1 sin incluir el ATG iniciador, obtenida por PCR con los cebadores Artx-5 y Artx-6, posterior digestión y clonaje en el sitio <i>BamHI/EcoRI</i> del vector.	Esta tesis
<b><i>pTEX-ble LYT1</i></b>	1730 pb	Reconstitución diferencial de los mutantes nulos. Transfección de <i>Phytomonas serpens</i> . Clonaje del inserto LYT1 obtenido por digestión <i>BamHI/SalI</i> del clon pRIBOTEX-LYT1 anterior	Esta tesis
<b><i>pTEX-ble LYT1<math>\delta</math>atg</i></b>	1727 pb	Reconstitución diferencial de los mutantes nulos. Clonaje del inserto LYT1 $\delta$ atg obtenido por digestión <i>BamHI/SalI</i> del clon pRIBOTEX-LYT1 $\delta$ atg anterior	Esta tesis

#### IV.1.9 Instrumentación

##### ➤ Para cultivos celulares

- ❑ Campanas estériles de flujo laminar vertical AV-10 de TELSTAR SA, *Cytair 125* y *Supcris Model A* de Equipments Scientifiques et Industriels SA *Flufrance*.
- ❑ Incubador con agitación orbital para cultivo de parásitos, *Lab-Line Orbit*.
- ❑ *Memmert*: incubador *Edelstahl RostFrei*
- ❑ *Environ-shaker*, *Lab-Line Instruments Inc*.



- Microscopios de objetivo invertido Leitz (*Labovert*) y *Olympus CK2*.
- *New Brunswick Scientific Co Inc* y *Gallenkamp*: Incubadores con agitación orbital para cultivos bacterianos *controlled Environment Incubator Shaker*, y agitador orbital *Gyrotory® Shaker-Model G2*.
- Incubadores de células
- Coulter: contador de células *Coulter Z-1*
- Microscopio de fluorescencia
- Microscopio confocal
- Incubador con agitación orbital para cultivo de parásitos *Revcon*.
- Estufa para bacterias

➤ **Para electroforesis**

- Cubetas para electroforesis horizontal de DNA IBI modelo NPH
- Sistema de electroforesis vertical *Mini-Protean II* de Bio-Rad.
- Sistema de electrotransferencia vertical *Mini-Protean II* de Bio-Rad.
- Fuentes de alimentación *Consort Microcomputer electrophoresis Power Suply*, *Sigma 500V* y *PS500XT* de *Hofer*.

➤ **Para electroporación**

- *BTX*: sistema de electroporación ECM 600 y cubetas *Disposable Cuvette P/N 620, 2 mm gap*.

➤ **Centrífugas**

- Centrífugas refrigeradas *Sorvall RC5C* y *Beckman J2MC*. Rotores de *Sorvall SS-34*, *GSA*, *HB-4* y *JS13.1*, y de *Beckman JA-20* y *JA-14*.
- Ultracentrífuga *Beckman L8-M*. Rotores de *Sorvall 70 Ti* y *AH-685*
- Centrífuga de mesa *Beckman GPR* y *Kubota KS8000* con rotores basculantes.
- Microcentrífugas de mesa *Beckman Microfuge 11* y *Hettich Mikroliter*.



➤ **Otros**

- ❑ Baños de temperatura constante *Precistern* de P-Selecta.
- ❑ Transiluminadores de UV *Fotodyne 6-3200* y *UVP TM 36*.
- ❑ Cámara fotográfica impresora *GELPRINTER*, modelo *00-GELPRINT*
- ❑ Secador de geles *Slab Gel Dryer SGD 4050* de *Savant*,
- ❑ Evaporador *Automatic Speed Vac® AS160* de *Savant*.
- ❑ Termocicladores para PCR *Robocycler 40* de *Stratagene* y *TempCycler* de *Coy*.
- ❑ Sonicador *Vibra Cell* de *Sonics and Materials Inc.*
- ❑ Espectrofotómetro de diodos *Hewlett Packard 8452 A* en interfase con un ordenador *Pentium 166 MMX*.
- ❑ Cámara fotográfica *Polaroid MP-4 LAND CAMERA*.
- ❑ Secuenciador (*ABI*) *373 Stretch* de *Applied Biosystems*, con estación de trabajo robotizada *Beckman Biomek 2000* y ciclador térmico *Perkin Elmer Geneamp PCR System 9600*.
- ❑ Contador para *ELISA Multiskan® Plus* de *Labsystems*
- ❑ Microscopio electrónico de transmisión *Zeiss 902*.
- ❑ *Pharmacia LKB: Gene ATAQ controller, ÄKTA Purifier*, para purificación de proteínas y nucleótidos.

#### IV.1.10 Aplicaciones informáticas

La elaboración y análisis de los datos experimentales se realizó en sistemas *Macintosh* y *PC Pentium* utilizando los siguientes programas informáticos:

➤ **Macintosh**

- ❑ *Kaleidagraph v.3.0.2* de *Adelbeck Software*
- ❑ *Gene Construction Kit v.1.03.1* de *Trinity Software*.
- ❑ *DNA Strider v.1.1* de *C. Marck y C.E.A.*



- *OLIGO* v.4.03 de Wojciech Dychlik
- *SeqEd* v.1.03; 1992

➤ **PC**

- Windows NT, 95, 98, 2000
- Paquete *Microsoft Office 97 y 2000* (*Microsoft Word, Microsoft Excel, y Microsoft Power Point*)
- *Adobe Photoshop™* version 5.5
- Adobe Acrobat
- Corel Draw
- End Note
- Diagnostics Instruments: Spot32
- Sigma Plot version 4.8
- Agfa Fotolook 3.50.01
- *DeskScan II 2.0©* Hewlett-Packard

➤ También se utilizaron los recursos ofrecidos por diferentes bases de datos:

- *EMBL*: secuencias de DNA y RNA (EMBL, Heidelberg, Alemania).
- *GenBank*: secuencias de DNA y RNA (*Laboratory Los Alamos, NM*)
- *NCBI* (Nacional Center for Biothecnology Information)
- Pedro's Biomolecular Tools
- SWISS-PROT
- La búsqueda de datos y de información bibliográfica se realizó a través del programa *Netscape Navigator™*



## **IV.2 MÉTODOS**

### **IV.2.1 Técnicas de Biología Celular**

- ✓ Las células y los estadios tripomastigote y amastigote del parásito *Trypanosoma cruzi* se contaron utilizando un hemocitómetro Neubauer (0.1mm<sup>3</sup>) tras diluir adecuadamente los cultivos, para obtener una distribución homogénea y una cantidad significativa en los campos a contar.
- ✓ El estadio epimastigote de *T. cruzi*, así como los promastigotes de *Leishmania tropica*, se cuantificaron usando el contador de células Coulter Z1, equilibrado correctamente.

#### **IV.2.1.1 Cultivo “in vitro” de T.cruzi**

##### ➤ ***De epimastigotes***

- Los cultivos del estadio epimastigote del parásito se realizaron según los casos, en frascos de cultivo de 25 o 75 cm<sup>2</sup> (Nunc) en medio LIT suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado. La temperatura de crecimiento es de 28°C. Se mantuvieron en fase exponencial por resiembras sucesivas, cuando el número de parásitos/ml era aproximadamente de 20 x 10<sup>6</sup> parásitos/ml. Alícuotas de parásitos fueron criopreservadas en medio de congelación (medio LIT con 10%SBF y 10%DMSO) a -80°C una semana y posteriormente transferidos a nitrógeno líquido.

##### ➤ ***De tripomastigotes metacíclicos***

- Epimastigotes crecidos a 28°C en medio LIT suplementado con 10% de SBFi se recogieron por centrifugación a 3000rpm durante 10 minutos, y se resuspendieron en medio Grace's suplementado con 5% de SBFi. Los



cultivos se mantuvieron a 28°C sin agitación, produciéndose el viraje de la forma epimastigote a la forma tripomastigote metacíclica. El mayor porcentaje de formas metacíclicas estables se obtuvieron al cabo de 30-45 días de cultivo. En el momento de la utilización de los metacíclicos, éstos se incubaron durante 45 minutos con una dilución 1:100 del complemento humano (*Sigma*), lo que produjo la lisis de parte de los epimastigotes aún presentes en la mezcla, y no de los metacíclicos que son resistentes a la lisis por complemento.

➤ *De tripomastigotes*

- Los tripomastigotes se obtuvieron por infección con metacíclicos de monocapas semiconfluentes de diferentes líneas celulares. El procedimiento fue el mismo en todos los casos, siguiendo el método descrito por Andrews y Colli (1982). La multiplicidad de infección fue de 100 parásitos/célula cuando se usaron metacíclicos y de 10 parásitos/célula cuando se usaron tripomastigotes, siendo el medio utilizado en las infecciones DMEM suplementado con 2% de SBFi. Las infecciones se llevaron a cabo en frascos estériles de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> (*Nunc*). A las 24 horas de la infección se lavaron las monocapas para eliminar los parásitos que no estaban infectando o asociados con las células y se añadió medio fresco (DMEM suplementado con 10% SBFi) a los cultivos. A las 96, 120 y 144 horas post infección, se recogieron los sobrenadantes que contenían las formas tripomastigotas emergidas por roturas celulares. Se centrifugaron a 2800rpm durante 20 minutos y se incubaron durante 2 horas a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub>, para permitir que las formas tripomastigotas, que son móviles, emergieran del sedimento. Cuidadosamente se recogieron los sobrenadantes (con los tripomastigotes purificados) sin perturbar el pellet (restos celulares y amastigotes). Alícuotas de las formas tripomastigotas son criopreservadas en medio DMEM con 10% SBFi y 10% DMSO.



➤ ***De amastigotes axénicos***

- Las formas amastigotas axénicas son las obtenidas extracelularmente a partir de las formas tripomastigotas purificadas. Diferentes autores han demostrado que las características morfológicas, bioquímicas y antigénicas son similares tanto en las formas amastigotas axénicas como en las intracelulares. Para su purificación, los tripomastigotes purificados tras ser lavados con PBS, se resuspendieron en medio LIT con 10% de SBFi, y se incubaron a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 36-48 horas [Andrews y col., 1987]. Tras este periodo, la mayoría de los tripomastigotes han virado a amastigotes, que son recogidos por centrifugación a 2800rpm durante 5 minutos, y almacenados a -80°C en el mismo medio de congelación que los epimastigotes, hasta su uso.

➤ ***Cambio de estadio “in vitro” de Trypanosoma cruzi***

- Epimastigotes crecidos en LIT + 10% SBF a 28°C hasta la fase semilogarítmica (10<sup>7</sup> parásitos/ml) de crecimiento, fueron transferidos a cultivos en DMEM+2%SBF-1%glutamina-5 µg/ml penicilina-streptomicina a 37°C, o se dejaron progresar hasta la fase de crecimiento estacionario en el medio LIT original a 28°C. Los cultivos fueron seguidos diariamente, y se determinó, a través de la observación al microscopio, el porcentaje de amastigotes en DMEM o de tripomastigotes metacíclicos en LIT.

#### **IV.2.1.2 Cultivo “in vitro” de Leishmania tropica**

➤ ***De promastigotes***

- Las formas promastigotes de *L. tropica* fueron cultivados a 28°C en medio 199 suplementado con 10% de SBFi. Las células se mantuvieron en fase logarítmica de crecimiento mediante resiembras adecuadas (4 x 10<sup>6</sup>





células/ml) cuando las células alcanzaban la fase estacionaria de la curva de crecimiento.

- Alícuotas de parásitos fueron conservadas hasta su uso a  $-80^{\circ}\text{C}$  y en nitrógeno líquido, tras recoger los parásitos por centrifugación a 2500g durante 10 minutos y resuspender en 1ml del medio de congelación (M199 con 20% SBFi y 10% glicerol). La congelación se realizó cuando el cultivo estaba en fase logarítmica de la curva de crecimiento ( $15-20 \times 10^6$  células/ml)
- Para recuperar los parásitos, las alícuotas se descongelaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaron a 2500g durante 10 minutos, con el objetivo de retirar el DMSO. Finalmente las células se resuspendieron en el volumen adecuado de medio de cultivo.

#### **IV.2.1.3 Cultivo in vitro de *Phytomonas serpens* T10**

- ✓ Los parásitos de esta especie se mantuvieron en medio Grace suplementado con 10% de SBFi creciendo a  $28^{\circ}\text{C}$ , por sucesivos pases cuando iniciaban la fase estacionaria de crecimiento. Alícuotas de los mismos fueron criopreservadas en el medio de cultivo suplementado con 20% de glicerol.

#### **IV.2.1.4 Obtención de sobrenadantes de parásitos.**

- ✓ Parásitos en fase logarítmica se recogieron por centrifugación, se lavaron tres veces en PBS, y dos veces en medio DMEM o LIT (en el caso de *T. cruzi*) o M199 (en el caso de *L. tropica*) sin suero. A continuación los parásitos se incubaron de 3 a 5 horas en medios condicionados a pH neutro o pH 5.5 a una concentración de  $10^8$  parásitos/ml, a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  en el caso de tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, y a  $28^{\circ}\text{C}$  en el caso de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. tropica*. Pasado el tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos para separar parásitos y sobrenadantes.



#### IV.2.1.5 Obtención de proteínas totales de parásitos

- ✓ La preparación de proteínas se realizó a partir de cultivos en fase exponencial tanto de *Leishmania* como de *T. cruzi*. Los parásitos se centrifugaron a 3000g durante 15 minutos. El precipitado se lavó tres veces con PBS frío estéril y se resuspendieron en buffer de carga para proteínas a una concentración de  $0.4 \times 10^6$  parásitos/ml. Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### IV.2.1.6 Fraccionamiento celular

- ✓ Epimastigotes en fase logarítmica fueron lavados 3 veces con PBS frío mediante centrifugación durante 10 minutos a 3500 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . las células sedimentadas se resuspendieron en el tampón de lisis (50 mM Hepes pH 7.8, 1 mM PMSF,  $0.7 \mu\text{g/ml}$  de pepstatina,  $0.5 \mu\text{g/ml}$  de leupeptina, aprotinina, y antipaína) a una concentración final de  $66.6 \times 10^7$  células/ml. A continuación se trataron con 0.1% de Tritón X-100 y se agitaron fuertemente. Tras centrifugar durante 15 minutos a 10000rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , se obtuvo por un lado la fracción citosólica (en el sobrenadante) y por otro la fracción de membranas (membrana plasmática, núcleo y mitocondria).

#### IV.2.1.7 Cultivo "in vitro" de líneas celulares eucariotas.

- **Células LLC-MK2, Vero, 3T3NIH y NRK**
  - Las líneas celulares LLC-MK2 y Vero, se utilizaron para la obtención de tripomastigotes y amastigotes de forma masiva, por ser muy susceptibles a la infección. Las líneas celulares 3T3NIH y NRK, se utilizaron en los diferentes experimentos de inmunofluorescencia.
  - El cultivo de todas estas líneas fue similar. Se cultivaron en frascos estériles de cultivo de  $75\text{cm}^2$  (Nunc), con medio DMEM (todos los casos excepto las células Vero) suplementado con 10% SBFi y 1mM de glutamina, a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ , o medio RPMI AB suplementado con 10% SBFi y 2 mM de



glutamina, en las mismas condiciones de cultivo. Cuando las monocapas se encontraron en estado confluyente, se tripsinizaron (*Gibco*), tras ser lavadas previamente con PBS, y se despegaron del frasco de cultivo. A continuación se añadió medio fresco, que diluyó la tripsina y el contenido soluble del frasco se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en un volumen adecuado para sembrar nuevos frascos o se resuspendieron en el medio de congelación (DMEM/RPMI AB, según el caso, con 10% SBFi y 10% DMSO) para ser criopreservadas.

➤ ***Macrófagos J774***

- El cultivo de este tipo celular presenta ciertos problemas por cuanto que son extremadamente sensibles a despegarse del frasco de cultivo ante cualquier estímulo. En general, se utilizaron frascos de 25-75 cm<sup>2</sup>, según los casos, y se mantuvieron en RPMI +AB suplementado con 10% SBFi y 2 mM de glutamina, y a 37°C. Cuando la monocapa alcanzaba un estado de confluencia, las células se despegaron mediante el uso de una espátula (*Sarstedt*), y se utilizaron para continuar el cultivo o para criopreservarlas a -80°C en el medio de congelación (RPMI AB + 20% SBFi + 10% DMSO), tras centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.

#### **IV.2.1.8 Transfección de parásitos por electroporación**

La transfección es una técnica que consiste en la introducción de material genético extraño en células eucariotas. El proceso se llevó a cabo en células de *L. tropica*, *T. cruzi*, y *P. serpens* mediante electroporación..

➤ ***Transfección de Leishmania tropica***

- Formas promastigotas de *L.tropica* fueron transfectadas siguiendo el procedimiento descrito por Kapler y col en 1990. Se centrifugaron parásitos en fase logarítmica, se lavaron y resuspendieron en tampón HBS a



concentración de  $10^8$  parásitos/ml. Se adicionaron 100  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico a 400  $\mu\text{l}$  de células y se incubaron en hielo durante 10 minutos en cubetas de electroporación BTX de 2 mm. Como control negativo se electroporó la misma cantidad de células en ausencia de DNA. La electroporación se llevó a cabo en un sistema de electroporación ECM 600 de BTX y las condiciones fueron: 400 V, 800  $\mu\text{F}$  y 13 ohms. Tras el choque eléctrico se incubaron los parásitos en hielo durante 10 minutos, y se añadieron a 10 ml de medio de cultivo. Se incubaron 24 horas a 28°C en ausencia de antibiótico y, transcurrido este tiempo, se adicionó 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de G418. Una vez obtenidos los parásitos resistentes a esa concentración de antibiótico (esto es cuando el tiempo de duplicación era igual al de los parásitos salvajes no transfectados), se aumentó progresivamente la concentración de G418 a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

➤ ***Transfección de Trypanosoma cruzi y P. serpens***

- Se utilizó como procedimiento de electroporación el descrito por Martínez-Calvillo y col., en 1997, basado en el utilizado por Hariharan y col., en 1993, con algunas modificaciones. Formas epimastigotas procedentes de un cultivo en fase semilogarítmica se recogieron por centrifugación y se lavaron una vez en PBS y dos veces en el tampón HBS. Se resuspendieron en ese mismo tampón a una concentración de  $6 \times 10^8$  células/ml. A continuación se incubaron durante 10 minutos en hielo 50  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico (en un volumen final del 50  $\mu\text{l}$ ) con 400  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular anterior, en las cubetas de electroporación previamente enfriadas en hielo. Las células se electroporaron con una única descarga de 360 V, 1500  $\mu\text{F}$  y 13  $\Omega$  usando el electroporador BTX600. Después de la descarga, las células electroporadas, se mantuvieron otros 10 minutos en hielo, tras lo cual se diluyeron en 10 ml de medio LIT (en el caso de *T. cruzi*) o Grace modificado (para *P. Serpens*). Finalmente se incubaron a 28°C durante 24 horas antes de iniciar la selección de los transfectantes con el antibiótico adecuado.



#### IV.2.1.9 Infecciones de células eucarióticas por parásitos

##### ➤ Infección de células por *Trypanosoma cruzi*

- Se infectaron monocapas de diferentes líneas celulares según interesara obtener grandes cantidades de tripomastigotes o amastigotes (líneas Vero y LLC-MK<sub>2</sub>) o de realizar los experimentos de inmunofluorescencia (NRK).
- Se usaron dos tipos de condiciones dependiendo de que interesara hacer un seguimiento a corto plazo o bien el contar los parásitos emergidos de las células al final del proceso.
- En las infecciones a corto plazo, se incubaron parásitos metacíclicos de *T. cruzi* con células NRK crecidas en monocapas sobre cristalillos redondos de 12 mm de diámetro. En estos experimentos no se requería un alto número de células infectadas por lo que la multiplicidad de infección (mdi) se redujo a 10, y el tiempo de incubación fue de 2 horas. La infección se llevó a cabo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A las 2 horas se lavaron las muestras con PBS<sup>++</sup> y se dejó que la infección continuara recogiendo las muestras a diferentes tiempos (2, 4, 6, 8, 12 horas), en que se lavaron las monocapas con PBS y se fijaron las muestras en 2% de paraformaldheido (PFA) en PBS, procediendo a su análisis.
- En los experimentos de infección a largo plazo, células crecidas en frascos de cultivo Nunc 75, fueron infectadas con tripomastigotes (mdi 1 parásito/célula) o parásitos metacíclicos (mdi 100) durante 2 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. La infección se retiró mediante lavados de las monocapas con PBS<sup>++</sup> varias veces incubando en medio fresco a 37°C y CO<sub>2</sub>, durante 90 horas, cuando empezaron a emerger los tripomastigotes de las células.

##### ➤ Infección de macrófagos J774 por *Leishmania tropica*

- Células en estado de semiconfluencia distribuidas en cristalillos de 12 mm de diámetro dispuestos en placas de 24 pocillos, fueron infectadas por las formas promastigotes de *L. tropica*. La m.o.i de infección utilizada



preferentemente fue de 1:20 y la infección se realizó en RPMI +ab suplementado con 5% de SBFi. Tras 6 horas, las células se lavaron, eliminando los parásitos que no habían infectado a los macrófagos, y se añadió medio fresco, esto es RPMI + ab suplementado con 10% de SBFi. La infección se mantuvo durante 96 horas, tomando muestras que fueron teñidas con Giemsa a las 24, 48, 72 y 96 horas.

➤ **Infección de macrófagos J774 por *Phytomonas* sp.**

- Se llevó a cabo de la misma forma que en el caso anterior.

➤ **Tinción con Giemsa**

- Cuando se quiso conocer de una forma rápida y sensible cuál era el porcentaje de invasión y parasitación en las infecciones llevadas a cabo por *L. tropica*, *P. serpens* o *T. cruzi*, se utilizó la tinción con giemsa, siendo el procedimiento similar en todos los casos. Tras lavar las muestras y retirar el medio de cultivo, se añadió metanol durante 1 minuto. Después de escurrir los restos de metanol, se añadió la solución de giemsa diluida al 10% en agua y se mantuvo en contacto con las muestras entre 8-10 minutos. A continuación las muestras se enjuagaron con agua durante 2-3 minutos y se secaron rápidamente. La visualización al microscopio fue directa sobre las muestras pegadas en los portas con el pegamento DPX (Gibco).

## IV.2.2 Técnicas de Biología Molecular

### IV.2.2.1 Cultivo y manipulación de bacterias

➤ **Cultivo de bacterias**

- ✓ Para asegurar la existencia de una población homogénea, los cultivos líquidos procedían de una colonia aislada en medio de cultivo sólido.



- ✓ Los cultivos de bacterias en los diferentes medios líquidos (en incubador con agitación) o sólidos (en estufa) se realizaron a 37°C en presencia del antibiótico adecuado en base al plásmido de resistencia que presentase la bacteria.
  - ✓ Alícuotas de bacterias fueron conservadas a -80°C con 50% de glicerol, cuando se encontraban en fase estacionaria de crecimiento.
  - ✓ La cuantificación de los cultivos bacterianos se realizó por medida de la densidad óptica del cultivo a 600 nm.
  - ✓ Preparación de células competentes
- Se utilizaron células competentes para la técnica de transformación, esto es, de la introducción de DNA exógeno, preparadas con dos métodos diferentes:

□ Método del CaCl<sub>2</sub>:

- El CaCl<sub>2</sub> tiene capacidad de hacer permeables las paredes celulares, de tal manera que el DNA presente en el medio extracelular tiene capacidad para atravesarlas con facilidad. Cuando células de *E. coli* se encontraban en fase exponencial de la curva de crecimiento (D.O<sup>600</sup> = 0.375-0.4) se trataron sucesivamente con MgCl<sub>2</sub> 0.1 M y CaCl<sub>2</sub> 0.1 M, y se conservaron a -80°C con un 50% de glicerol. La eficiencia de transformación fue de 1 x 10<sup>6</sup> células/μg de DNA plasmídico.

□ Células electrocompetentes:

- Las células fueron crecidas hasta alcanzar la fase exponencial de la curva de crecimiento (D.O<sub>590</sub> = 0.5-1), momento en el que fueron recogidas y lavadas varias veces con agua bidestilada fría estéril. Tras los lavados, se resuspendieron en glicerol al 10% y fueron alicuoteadas y criopreservadas a -80°C hasta su uso

➤ **Transformación de bacterias**

Se transformaron bacterias por choque térmico y electroporación.

□ Choque térmico:

- La entrada de DNA plasmídico en células bacterianas competentes por el método del CaCl<sub>2</sub> se ve facilitada por un breve choque térmico.



El procedimiento se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan en 1983. y consiste en incubar aproximadamente 100  $\mu$ l de células competentes en hielo durante 30 minutos con 10-100  $\mu$ g de DNA plasmídico. A continuación, esta mezcla se somete a un choque térmico de 1 minuto a 42°C y posterior incubación durante 5 minutos en hielo. Se recuperan las bacterias por adición de 300  $\mu$ l de medio LB e incubación a 37°C durante 30 minutos a 1 hora, tras lo cual, las células se siembran en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico que corresponda.

- Electroporación:
  - Células competentes (40  $\mu$ l), obtenidas por lavados con agua bidestilada fría estéril y resuspendidas en glicerol al 10%, se incubaron con el DNA plasmídico en hielo durante 1 minuto. La mezcla se introdujo en una cubeta de electroporación (BTX P/N 620 2mm), previamente enfriada en hielo. La electroporación se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 2.5 KV, 129 ohm y un tiempo de 5-6 msec. Inmediatamente se añadieron 0.960 ml de medio SOC o del medio LB, y la mezcla se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml. Las células se recuperaron durante 1 hora a 37°C, y se sembraron en placas con medio LB y el antibiótico de selección, precalentadas a 37°C.

#### IV.2.2.2 Purificación de DNA

##### ➤ Purificación de DNA genómico de *T. cruzi*

- Para la extracción de DNA genómico total de epimastigotes de *T. cruzi* se partió de cultivos en fase logarítmica. Se recogieron por centrifugación y se lavaron 3 veces con PBS frío. A continuación se resuspendieron las células en un tampón de extracción (1/10 del volumen inicial), al que se le añade RNAasa fresca (20  $\mu$ g/ml). Después de incubar la solución anterior a 37°C





durante 1 hora, se añadió proteinasa K a una concentración final de 100µg/ml, y se continuó la incubación a 50°C durante 3 horas más. A continuación se separó el DNA de las proteínas mediante extracciones sucesivas con un volumen de fenol y fenol:cloroformo. Se precipitó por último con Acetato sódico 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, lavándose con un volumen de etanol 70%. Finalmente se resuspendió en TE pH 8.0.

➤ **Purificación de DNA plasmídico**

□ DNA plasmídico a pequeña escala:

Se han utilizado diversos procedimientos para aislar DNA plasmídico en pequeña escala (minipreps) a partir de células de *E. coli* transformadas. El más utilizado es el método de la lisis alcalina. En este método, las células son lisadas en una solución de detergente a pH alcalino lo que provoca la desnaturalización del DNA. Posteriormente, la solución se neutraliza y el DNA plasmídico, debido a su tamaño y estructura, se renaturaliza manteniéndose en solución, mientras que el DNA cromosómico precipita junto al detergente y las proteínas. El procedimiento de lisis alcalina se llevó a cabo a través del Kit Wizard™ MiniPreps de Promega, con el que el DNA plasmídico procedente de 1.5 ml de cultivo de células transformadas es retenido por una resina, lavado y finalmente eluido con agua destilada. En general, se siguió el protocolo recomendado por la casa comercial.

□ DNA plasmídico a gran escala:

para la obtención de grandes cantidades de DNA plasmídico se utilizó el Kit PerfectPrep® Plasmid Maxi de Eppendorff. El procedimiento es similar al anterior pero se partió de volúmenes de cultivo bacteriano entre 250-500 ml.



#### IV.2.2.3 Cuantificación de Ácidos Nucleicos

- ✓ La cuantificación y el grado de pureza de las distintas muestras de DNA, se determinaron midiendo la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm. La relación entre ambas absorbancias siempre fue mayor de 1.8, indicando que no existía contaminación proteica [Sambrook y col., 1989]. Una unidad de A260 presenta las siguientes equivalencias según el tipo de ácido nucleico que se mide: equivale a 50 µg/ml para el DNA de doble cadena, a 40 µg/ml para el RNA, y de 33 µg/ml para oligonucleótidos.

#### IV.2.2.4 Tratamientos enzimáticos del DNA

- **Tratamiento con endonucleasas de restricción**
  - Las endonucleasas de restricción reconocen determinadas secuencias del DNA de diferente longitud (aunque generalmente son cortas), según el tipo de endonucleasa, y rompen la doble cadena en el lugar de reconocimiento, generando fragmentos discretos de DNA. Las digestiones se realizaron según las especificaciones proporcionadas por las diferentes casas comerciales, según el tipo de enzima de restricción. Se realizaron en un volumen final de 30 µl con 1-10 unidades de enzima por microgramo de DNA e incubándose dos horas a la temperatura recomendada.
- **Tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli***
  - Este tratamiento fue usado para generar extremos romos en fragmentos procedentes de la digestión con extremos 5'protuberantes, ya que esta enzima posee actividad DNA polimerasa 5'a 3'pero carece de la actividad exonucleasa 3'a 5'. Esta reacción requiere la presencia de dNTPs y las condiciones usadas fueron las recomendadas por el fabricante.



➤ **Tratamiento con la DNA polimerasa del fago T4**

- Este tratamiento se utilizó para generar extremos romos a partir de fragmentos procedentes de la digestión con extremos 3' protuberantes, ya que esta polimerasa posee una actividad polimerasa 5'a 3'y una actividad exonucleolítica 3'a 5' en ausencia de DNA molde, doscientas veces superior al fragmento Klenow. Esta enzima puede ser utilizada también para rellenar extremos 5' protuberantes.
- Una vez digerido el fragmento a rellenar, la reacción se realiza agregando 1U de enzima e incubando durante 1 hora a 12°C en presencia de alta concentración de nucleótidos para equilibrar la reacción de polimerización con la alta actividad exonucleasa.

➤ **Tratamiento con fosfatasa alcalina**

- La fosfatasa alcalina hidroliza el fosfato del extremo 5' del DNA, RNA y ribo- y deoxy-nucleósidos trifosfatos. Fue utilizada para defosforilar vectores cortados en extremos romos o extremos compatibles cohesivos con el fin de evitar su religación, y producir una mayor eficiencia en el clonaje. La fosfatasa utilizada fue aislada del intestino bovino ("*Calf Intestinal Phosphatase*", CIP), en las condiciones indicadas por el fabricante. La reacción se realizó agregando 1 unidad de enzima a las digestiones con endonucleasas e incubando 30 minutos a 37°C.

➤ **Tratamiento con DNA ligasa**

- Se utilizó la enzima DNA ligasa del fago T4, que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre un fosfato 5'y un hidroxilo 3' de DNA de cadena doble, tanto en extremos romos como en cohesivos complementarios. Las reacciones de ligación se realizaron en volúmenes de 10 µl utilizando relaciones molares inserto:vector de 5-10:1 (5-10 pmoles de inserto:1 pmol de vector). Cuando los extremos a ligar eran cohesivos, se incubaron a



temperatura ambiente durante períodos de 4 horas, y de 10-14 horas a 16°C cuando eran extremos romos.

➤ **Tratamiento con DNAsa I**

- La endonucleasa DNAsa I extraída de páncreas bovino, degrada el DNA de doble cadena para producir 3'-hidroxiloligonucleótidos [Moore, 1981] y requiere para su actividad la presencia de cationes divalentes, variando la especificidad de la reacción en función del catión divalente presente [Campbell y Jackson, 1980]. Cuando la reacción tiene lugar en presencia de Mg<sup>2+</sup>, la enzima corta una cadena de la doble hebra de DNA, produciendo nicks, pero en presencia de Mn<sup>2+</sup>, corta la doble hebra dejando extremos romos o protuberantes en tan solo uno o dos nucleótidos. La reacción, en la que se mezcló el DNA con la enzima diluida (3mU/μl) en tampón de corte (10 mM MnCl<sub>2</sub>; 50 mM Tris HCl pH 7.6), se llevó a cabo en un volumen final de 0.1 ml y a 15°C durante un tiempo que se determinó mediante análisis previo de diferentes alícuotas tomadas a diferentes tiempos. La reacción se detuvo añadiendo 10 μl de EDTA 50mM.

**IV.2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

- ✓ La reacción en cadena de la polimerasa permite la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de DNA, obteniendo como resultado grandes cantidades de ese DNA específico a partir de DNA de cadena doble o simple. El procedimiento implica una serie de ciclos repetidos en los que se produce en cada ciclo la desnaturalización del DNA, la unión de los oligonucleótidos cebadores a la secuencia específica del DNA, y la extensión de la secuencia, originando una amplificación exponencial de la molécula de DNA [Amheim y Ehrlich, 1992]. Esta técnica usa una DNA polimerasa termoestable. El volumen de la reacción fue de 50-100 μl. La mezcla de la reacción contuvo dNTPs a 0.25 mM, 100 ng de cebadores y DNA molde. Las condiciones de la reacción, en particular las temperaturas de



hibridación de los cebadores y los tiempos de elongación de las cadenas, se optimizaron para cada ensayo. En cuanto a las temperaturas, se determinaron parámetros iniciales mediante la determinación de las  $T_m$  de los oligos según  $[T_m(^{\circ}C)=4x(G+C)+2x(A+T)]$ . El tiempo de elongación fue dependiente de la longitud del fragmento a amplificar según lo establecido para la Taq polimerasa de 1000 pares de bases/minuto. En general, las condiciones más utilizadas fueron de 35 ciclos en tres etapas: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación entre 1 y 3 minutos, y extensión entre 1 y 3 minutos a 72°C.

#### IV.2.2.6 *Electroforesis de ácidos nucleicos*

##### ➤ *De DNA en geles de agarosa*

- El DNA de cadena doble puede ser separado, identificado y purificado por electroforesis en geles horizontales de agarosa, sumergidos en tampón TAE 1x. En función de los tamaños de los fragmentos a separar, se usaron geles con distinta proporción de agarosa, desde 0.8 al 4% en tampón TAE. La visualización de los patrones de bandas de las muestras se realizó mediante la adición al tampón de electroforesis de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y posterior exposición en un transiluminador a 254nm. La documentación fotográfica se llevó a cabo mediante fotografía Polaroid o captación de la imagen en una videocámara-impresora.

#### IV.2.2.7 *Aislamiento de DNA de geles de agarosa.*

Se purificaron fragmentos de DNA de geles de agarosa mediante difusión o mediante una técnica denominada *Gene Clean® (Bio101)*.

##### ➤ *Difusión en acetato amónico*



- En el caso de fragmentos menores de 200 pb, la obtención de éstos se hizo por difusión en acetato amónico del bloque de agarosa cortado con una espátula que contenía el fragmento de DNA a purificar. El bloque se incubó toda la noche con 125 µl de acetato amónico 0.5 M a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó y se tomaron 100 µl de la solución, que se precipitaron mediante la adición de 3 volúmenes de EtOH.

➤ **Gene clean®**

- Básicamente se siguió el protocolo propuesto por la casa comercial. El fragmento de gel que contiene el DNA es disuelto en una solución de NaI a 45-55°C. Después el DNA es retenido específicamente por un gel de sílice (Glass Milk®). La resina que contiene el DNA se lava con una solución de etanol para eliminar impurezas y se eluye en un pequeño volumen de agua.

#### IV.2.2.8 Secuenciación de DNA

- ✓ La secuenciación de DNA se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos descrito por Sanger y col.,(1977). El método se basa en la parada de la síntesis de DNA por una polimerasa mediante la incorporación de un monómero dideoxi-, que frena la elongación de la cadena a partir de un cebador, por no tener un hidroxilo 3' al que añadir el siguiente nucleótido trifosfato. Haciendo cuatro reacciones en paralelo, cada una de las cuales emplea una base dideoxi-determinada, se obtiene la información completa de la secuencia.
- ✓ Parte de la secuencia se realizó utilizando un secuenciador automatizado *BaseStation* de Millipore. Las reacciones de secuencia se realizaron con dideoxinucleótidos como terminadores, pero la elongación, a partir de cebadores fluoresceínados en su extremo 5', se realizó por medio de PCR lineal con *Taq* polimerasa (Promega). Las reacciones de secuenciación consistieron en 400 fmoles de DNA plasmídico, 6 pmoles de cebador fluoresceínado, tampón, terminadores y *Taq*, según el protocolo *Fmol* de Promega.



- ✓ Las condiciones de PCR para los cebadores universales T3, T7, y SP6 fueron las siguientes: 2 minutos a 96°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 53°C y 1.5 minutos a 70°C. En el caso de los cebadores internos de la secuencia, la temperatura de hibridación fue modificada según la  $T_m$  del oligo.
- ✓ También se secuenció utilizando el kit *AmpliTaqDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing* de *Perkin Elmer* basándonos en una optimización llevada a cabo por nuestro laboratorio [Lario y col., 1997] en la que comprobaron que se obtenían mejores resultados usando un 19% menos de ddNTPs y un 75% más de dNTPs respecto a la mezcla recomendada por la casa comercial. Para ello las reacciones se prepararon con modificaciones sobre el método descrito por Sanger y col., en 1977. En tubos de PCR se mezclaron en un volumen final de 20  $\mu$ l: 4  $\mu$ l de tampón 5x; mezcla de dNTP (65.63  $\mu$ M de dITP y 13.13  $\mu$ M de cada d(A, C, y T)TP); mezcla de ddNTP (0.61  $\mu$ M de terminador DyeDeoxyA, 18.28  $\mu$ M de terminador DyeDeoxyC, 0.16  $\mu$ M de terminador Dye DeoxyG y 36.56  $\mu$ M de terminador DyeDeoxyT; 4U de *AmpliTaq* DNA polimerasa; 0.8  $\mu$ g de DNA; y 3.2 pmoles de cebador.
- ✓ La reacción de PCR se llevó a cabo en el *GeneAmp PCR system 9600* de *Perkin Elmer* con las siguientes condiciones: 96°C durante 1 minuto; 96°C durante 15 segundos, 50°C durante 15 segundos y 60°C durante 4 minutos en un total de 25 ciclos.
- ✓ Los datos se almacenaron en un ordenador *Apple Macintosh Quadra 650* en la aplicación de recogida de datos (versión 1.2.1; 1993) del programa *MacOS 7.5.1*. Posteriormente, las secuencias fueron editadas utilizando el programa *SeqEd* (versión 1.0.3; 1992).

### IV.2.3 Técnicas de Análisis proteico e inmunológicas

#### IV.2.3.1 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

- ✓ La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS permite la separación de proteínas en base a su tamaño e independientemente de la carga eléctrica particular de cada péptido. Se siguió el método de Laemmli (1970).



El principio de la separación radica en que el SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas y se une a estas en relación directa a su peso molecular. Así el SDS les confiere una carga neta negativa proporcional a su longitud. De este modo la migración relativa ( $M_r$ ) de las proteínas hacia el ánodo, al estar éstas uniformemente cargadas, es inversamente proporcional a su masa y se puede realizar una curva patrón a partir de los tamaños y distancias de migración de las proteínas control que se corren junto con las proteínas de interés. El sistema electroforético es discontinuo y se utiliza un gel doble, en su parte superior de composición constante y el inferior de porcentajes variables de acrilamida/bis-acrilamida según los pesos moleculares de las proteínas a separar.

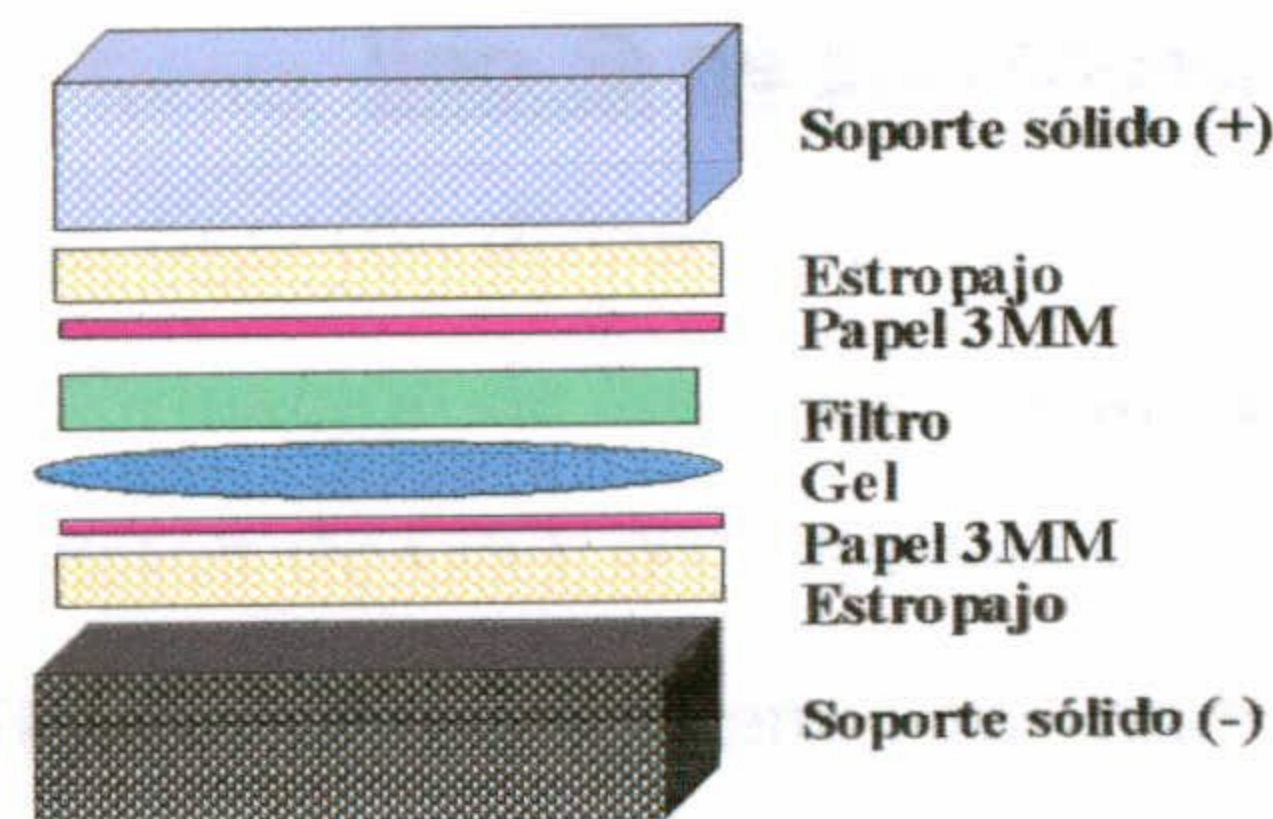
- ✓ La composición del gel superior (empaquetador o “*stacking*”) es de 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 4% acrilamida, 0.1% bis-acrilamida y su polimerización se lleva a cabo mediante la adición de 0.2% de persulfato amónico y 0.15% TEMED. La composición del gel inferior (separador o “*resolving*”) es 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, polimerizados con 0.05% de persulfato amónico y 0.2% de TEMED. Los porcentajes de acrilamida/bis-acrilamida utilizados han variado entre 7.5 y 20%.
- ✓ Las muestras se separaron siempre en condiciones reductoras con un volumen igual de tampón de carga (2x), quedando la muestra a concentración final de 10% glicerol, 2.5% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, y 0.002% BPB. Previamente a su separación electroforética se desnaturalizaron y se redujeron los puentes disulfuro calentando las muestras a 98°C durante 3 minutos.
- ✓ La composición del tampón de electroforesis utilizado es 0.1% SDS, 0.2 M glicina y 25 mM Tris-HCl pH 8.3. Se utilizó la cubeta *Miniprotean II* de *Bio-Rad*. Las separaciones se realizaron utilizando voltajes constantes entre 25 y 150 V aplicados por una fuente *IBI Electroforesis Compact Power Supply*. Generalmente los geles obtenidos fueron fijados y teñidos con azul de *Coomasie R-250* o bien utilizados para transferencia de las proteínas separadas a filtros de nylon para su posterior inmunodetección mediante anticuerpos específicos. Por lo general, los geles fueron teñidos durante 15-30 minutos con una solución de 10% MeOH, 10% HAc, 0.2% *Coomasie R-250* en agitación, y se destiñeron en la misma solución pero sin el colorante. Una vez destiñido el fondo, los geles fueron secados en un secador de geles durante una hora a 80°C, entre dos hojas de papel celofán.





#### IV.2.3.2 Transferencia a membranas de proteínas separadas por SDS-PAGE ("Western Blot").

- ✓ Las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF, *Immobilon-P*, Millipore) en un *TransBlot Cell* de *Bio-Rad*. Tras la electroforesis, los geles se equilibraron 5 minutos en tampón de transferencia (CAPS 10 mM pH 11, 10% metanol) para facilitar la difusión del SDS y la glicina durante 2 minutos. Previo a la transferencia, las membranas de nylon se sumergieron en metanol durante varios segundos, se lavaron abundantemente con agua destilada y se equilibraron durante 5 minutos en el tampón de transferencia. Se montó el *sandwich* de transferencia con el gel, la membrana y el papel Whatman humedecidos en tampón de transferencia, y las proteínas se transfirieron a la membrana durante 1 hora a 60 V y 2 horas a 90 V con agitación y a 4°C.



- ✓ Una vez completada la transferencia, se tiñeron los marcadores durante 1 minuto en una solución de 10% MeOH, 0.1% Coomasie, y 10% HAc o 0.1% fast green, según los casos. Se destiñeron rápidamente con 50% MeOH, 10% HAc para visualizar los marcadores de peso molecular y la eficiencia de la transferencia.

#### IV.2.3.3 Precipitación de proteínas

##### ➤ Con acetona

- Proteínas presentes en sobrenadantes de parásitos fueron precipitadas por la adición de 5 volúmenes de acetona en frío e incubación a -20°C durante 1



siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 0,58  $\mu\text{M}$ , leupeptina y pepstatina a 1  $\mu\text{g/ml}$ , y EDTA 50 mM. Acto seguido, las células se rompieron por sonicación durante 10 minutos de forma discontinua y en hielo, para evitar el calentamiento de la muestra. El material insoluble se separó del sobrenadante centrifugando a 10000rpm ( a 4°C, rotor SS-34) durante 10 minutos, tras lo cual el sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de acetato de nitrocelulosa de 0.2  $\mu\text{m}$  para eliminar los restos del material insoluble.

➤ ***Absorción del lisado a la columna***

- ❑ Columnas de 2 ml de GSH-Sepharose 4B fueron almacenadas en PBS con 20% de EtOH a 4°C hasta su uso. Antes de la purificación, se lavaron con 20 ml de PBS y se equilibraron con 20 ml de tampón de lisis.
- ❑ El lisado proteico anterior filtrado, se pasó por la columna (a 4°C ) por lo menos 5 veces para asegurar una completa absorción de la proteína. La columna se lavó dos veces con 20 ml de PBS. A continuación existe la opción de eluir la proteína de fusión completa, utilizando GSH; o de cortar la quimera para obtener el dominio carboxilo terminal, cortando la quimera con trombina.

➤ ***Elución de la proteína de fusión***

- ❑ La adición de GSH a la columna desprenderá la proteína de fusión con GST por competición por los sitios de unión de GSH reducido. Previamente a la adición de GSH, se lavó la columna con 20 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, para luego añadir el mismo tampón pero con 5 mM de GSH en alícuotas de 0.5 ml reuniéndolas separadamente. Las alícuotas se analizaron por SDS-PAGE para comprobar la presencia de la proteína. Se juntaron aquellas que la contenían y se dializaron frente a  $\text{NH}_4\text{Ac}$  0.1M durante 48 horas con 5 cambios para eliminar la GSH y se liofilizaron almacenándose hasta su uso a -20°C.



➤ **Corte con trombina de la proteína de fusión**

- ❑ Se recogió la resina lavada con la quimera absorbida y se transfirió a un tubo de centrifuga de 10 ml. Se lavó 2 veces con 8 ml de tampón de lisis, eliminando el tampón por centrifugación a 500g durante 30 segundos. Se equilibró la columna con dos lavados de 8 ml con el tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) y dos lavados de 10 ml de tampón de corte (tampón de lavado con 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>). A continuación se resuspendió la resina en 5 ml de tampón de corte y se añadió la trombina.
- ❑ Se cuantificó previamente la cantidad de proteína pegada a la columna tomando 5 µl de resina y analizándola por SDS-PAGE. En base a la estimación realizada, se añadió una cantidad de trombina aproximadamente entre 0.2-1% (p/p) de la proteína de fusión absorbida a la columna, incubándose durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Se recuperó la proteína cortada por centrifugación a 500g durante 30 segundos, y la resina se lavó cuatro veces más con 1 ml de tampón de corte recogiendo los sobrenadantes. Se analizaron las muestras por SDS-PAGE y se juntaron aquellas con proteína, volviéndose a pasar la mezcla por otra columna fresca de GSH- Sepharosa para eliminar los restos de GST y quimera que pudieran quedar. El efluente se dializó y liofilizó del mismo modo que como para las proteínas de fusión.

#### IV.2.3.5 Cuantificación de proteínas

➤ **Método de Bradford**

- ❑ La concentración de proteínas en las diferentes muestras se conoció mediante el método colorimétrico de Bradford (1976). Se basa en la unión cuantitativa de un colorante, el azul Coomassie brillante a las proteínas. Esta unión se detecta a una longitud de onda de 596 nm, y la concentración de proteínas en la muestra es proporcional a la medida de densidad óptica obtenida. Las medidas obtenidas se comparan con una curva patrón



realizada previamente con diferentes muestras de concentración creciente conocida de albúmina bovina desde 1  $\mu\text{g/ml}$  hasta 1  $\text{mg/ml}$ , dando el valor de concentración de las muestras problema.

➤ **Por medida de absorbancia a 280 nm.**

- A 280 nm se obtuvieron medidas de absorbancia relativas a la concentración de aminoácidos aromáticos en solución, principalmente residuos de triptófano y tirosina, y en menor extensión a residuos de fenilalanina, basándose en la propiedad de estos residuos de absorber luz ultravioleta. A partir de las medidas de absorbancia se calculó el coeficiente de extinción molar en función del contenido en aminoácidos aromáticos de las proteínas según lo descrito por Gill y Von Hippel en 1989, y con ese valor se determinó la concentración proteica de las muestras.

#### **IV.2.3.6 Conjugación de proteínas a CNBr-Sepharose 4B**

- ✓ La sepharosa 4B (*Pharmacia*) activada con bromuro de cianógeno (CNBr), es una resina de poro ancho a la que se pueden conjugar proteínas a través de sus grupos amino primarios libres constituyendo así columnas de afinidad que permiten la purificación de ligandos específicos de la proteína acoplada. La resina (0.3 g) se lavó con 250 ml de HCl 1 mM, se mezcló con 3 mg de ligando en 5 ml de tampón de acoplamiento ( $\text{NaHCO}_3$  0.1 M pH 8.5, 0.5 M NaCl), y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La resina se vertió en una jeringa de 5 ml taponada con lana de vidrio y al efluente se le midió la concentración de proteína a 280 nm verificando de este modo la eficiencia del acoplamiento. Se lavó con tampón de acoplamiento para eliminar el exceso de ligando. Los restantes sitios activos se bloquearon por incuación de la resina con Tris-HCl 0.1 M pH 8.4 durante 2 horas a temperatura ambiente. La columna se lavó con 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  (200 ml), agua (100 ml), 50 mM glicina-HCl pH 2.9 (200 ml), agua y 0.1 M Tris-HCl pH 7.9. Por último, la columna se almacenó en 0.1 M Tris-HCl con 0.01%  $\text{NaN}_3$  hasta su uso.



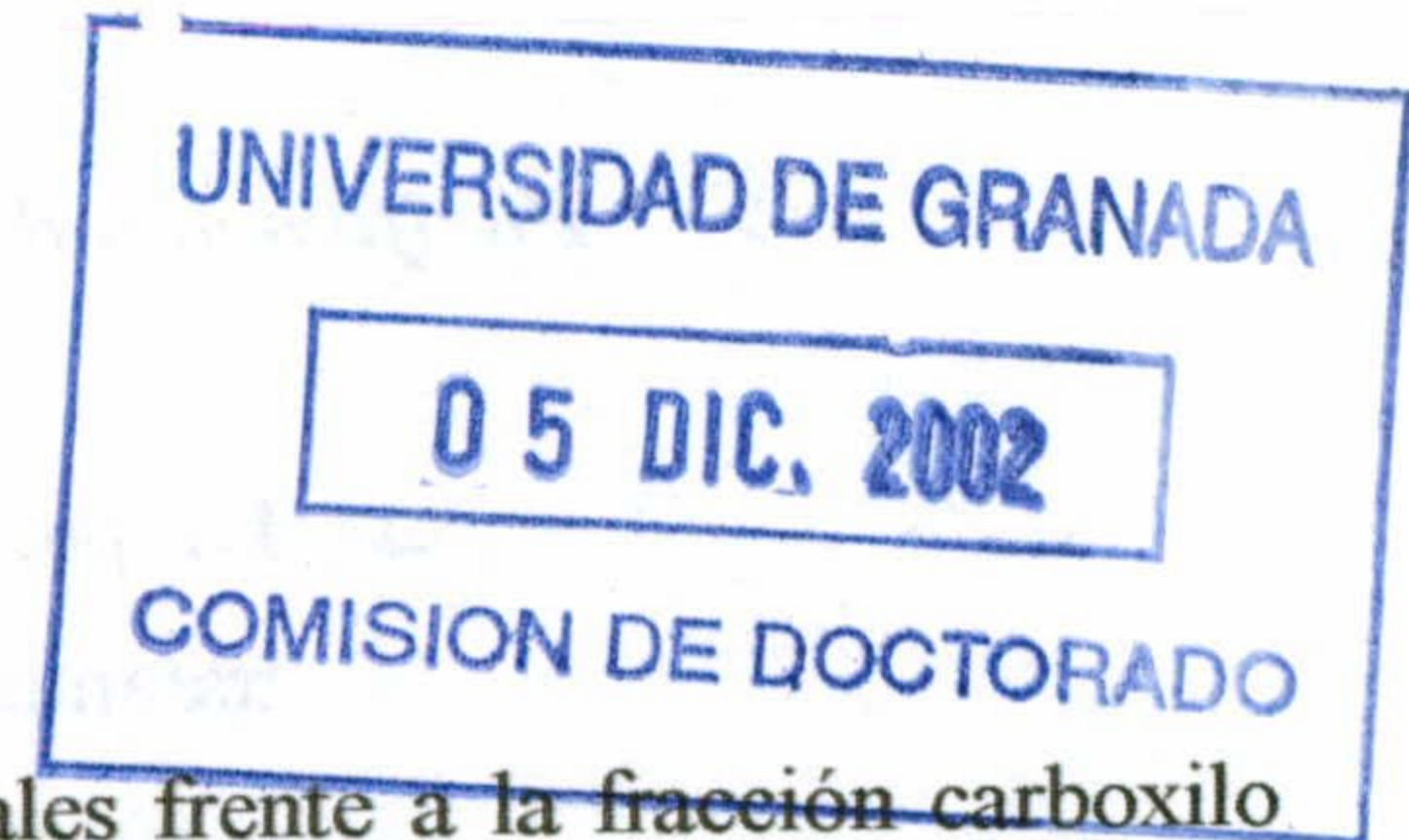
#### IV.2.3.7 Obtención de anticuerpos

##### ➤ Inmunización

- Para la obtención de anticuerpos policlonales frente a la fracción carboxilo terminal de la proteína LYT1, se utilizaron conejos de la cepa de conejos New Zealand White (NZW). Previamente a la inmunización de los animales, se tomaron muestras de suero para su uso como control (suero preinmune) en los ensayos serológicos. Los anticuerpos se obtuvieron mediante inmunización vía subcutánea de los conejos en tres ocasiones, con la proteína recombinante purificada. El protocolo de inmunización fue el siguiente:
- Primera inmunización con 50 µg de la proteína de fusión truncada (GST-LYT1tr) en 500 µl PBS con un volumen igual de Adyuvante completo de Freund (CFA) en 3 sitios diferentes.
  - Segunda inmunización dos semanas después: el conejo se inoculó con 100 µg de la proteína truncada en el mismo volumen pero con un volumen igual de Adyuvante Incompleto de Freund (IFA).
  - Tercera inmunización dos semanas después: en idénticas condiciones a la anterior.
  - A los 10 días de la última inoculación, se extrajeron 15 ml de sangre al conejo y se midió el título por ELISA. Una semana después se llevó a cabo la sangría final de la vena marginal de la oreja.

##### ➤ Obtención del suero

- Los sueros se prepararon por coagulación de la sangre durante 3 horas a 37°C, enfriando los tubos durante 5 horas a 4°C, para favorecer la contracción del coágulo, y centrifugando durante 20 minutos a 2000g. Los sobrenadantes se almacenaron en alícuotas con azida sódica (0.02%) a 4°C y a -80°C.





➤ **Purificación de la fracción IgG de suero de conejo**

- La purificación de la fracción IgG del suero de conejo se realizó por tratamiento con ácido caprílico (ácido n-octanoico) en medio ácido provocando la precipitación de las proteínas séricas a excepción de las IgG, resultado en un enriquecimiento parcial de los sueros. Para ello, se midió el volumen de suero a purificar (volumen inicial) y se añadieron 2 volúmenes de NaAc 60 mM pH 4.0, ajustando el pH final de la mezcla a 4.8. A continuación se añadió el caprilato (*Sigma*) gota a gota con agitación muy suave y a temperatura ambiente en una proporción de 0.75 ml por cada 10 ml de volumen inicial. Se permitió que la precipitación continuara durante 30 minutos más manteniendo la agitación, y se centrifugó la muestra a 10000g. Se decantó el sobrenadante, y se dializó durante toda la noche con tres cambios de PBS.
- Tras seleccionar con caprilato la fracción IgG de los sueros, se procedió a absorberla a una columna de sepharosa 4B activada en la que previamente se había acoplado un lisado de bacterias transformadas con pGEX-2T, en las que se indujo la expresión de GST con IPTG. Tras 4 o 5 pases del suero a través de la columna se produjo la adsorción de IgGs contaminantes, saliendo en el efluente el suero con IgGs frente a la fracción carboxilo terminal de la proteína LYT1. Finalmente, estas IgGs fueron adsorbidas a una columna de afinidad LYT1 (fracción carboxilo terminal)-sepharosa, que se lavó con TBST y se eluyó en alícuotas de 0.5 ml de glicina HCl pH 2.9. Estas fracciones se recogieron en tubos que contenían 0.25 ml de 1M Tris-HCl pH 8.0, con lo que se neutralizó el pH ácido. Finalmente se midió la concentración de IgGs purificadas a 280 nm, teniendo en cuenta que 1 D.O.280 de IgG es 0.75 mg/ml.



#### IV.2.3.8 Técnicas serológicas

##### ➤ *Enzyme-Linked Immunoabsorben Assay (ELISA)*

- Para llevar a cabo esta técnica [Engvall y Perlman., 1971], se utilizaron microplacas de fondo plano (p96, *Nunc Maxisorp*). Los pocillos se tapizaron con 200  $\mu$ l del péptido o de la proteína de fusión (1  $\mu$ g/ml) disuelta en  $\text{NaHCO}_3$  100 mM pH 9.5 toda la noche a 4°C. Se eliminó el exceso de proteína no absorbido lavando cada pocillo tres veces con TBST y se bloquearon con 200  $\mu$ l/pocillo de TBST + 5% leche desnatada (Molico, Nestlé) durante 2 horas a 37°C tras lo cual se eliminó el líquido, siendo las placas tapizadas almacenadas hasta su uso a -20°C.
- Se prepararon diluciones seriadas comprendidas entre 1:100 y 1:500000 de suero inmune y preinmune en TBST. En cada pocillo se añadió 200  $\mu$ l de las diferentes diluciones y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavaron 2 veces y se revelaron añadiendo 100  $\mu$ l de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a fosfatasa alcalina en una dilución 1:3000 en TBST e incubando a 37°C durante 30 minutos. Las placas se lavaron de la misma manera a la anterior y se revelaron por la adición de 200  $\mu$ l/pocillo de para-nitrofenil fosfato (pNPP) disuelto en tampón dietanolamina (20 mM pH 9.5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM) a una concentración 1mg/ml. La reacción se terminó añadiendo 50  $\mu$ l/pocillo de EDTA 0.2 M pH 8.0, y la absorbancia a 405 nm se determinó en un lector de placas *Titertek*. Los ensayos se hicieron en pocillos duplicados.

##### ➤ *Inmunodetección en membranas (Western Blot)*

- Los geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de difluoropolivinilideno (PVDF) Immobilon-P, que presentan un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m, capaces de retener proteínas de más de 10 Kda. Una vez realizada la transferencia, la membrana fue bloqueada con 1% albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) en TBST con 0.02% de  $\text{NaN}_3$  durante toda la



noche a 4°C con agitación. La detección inmunológica se realizó generalmente con una dilución 1:500 de los anticuerpos en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Los filtros se lavaron varias veces con TBST y se incubaron 1 hora con una dilución 1:3000 en TBST de antisuero anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina. Las membranas se lavaron de nuevo 5 veces con TBST. A continuación las membranas se equilibraron durante 1 minuto con el tampón de revelado (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, y 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Los filtros se revelaron con los sustratos precipitables NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride, *Boehringer*) y BCIP (5-bromo, 4-cloro-3 indolil fosfato, *Sigma*) en el mismo tampón anterior. Transcurrida la reacción enzimática, se formó un compuesto azulado unido a la proteína ligada al anticuerpo primario. Cuando las bandas eran visibles, la reacción se detuvo al poner en contacto el filtro con agua bidestilada.

#### IV.2.3.9 Inmunofluorescencia en parásitos

##### ➤ *Ensayos de inmunolocalización*

- En los ensayos de inmunofluorescencia indirecta se utilizaron cristalillos redondos de 12 mm de diámetro situados en placas de 24 pocillos (*Nunc*), que fueron tratados, previamente al contacto con los parásitos, con una mezcla de poli-L-lisina al 10% en 5% de bicarbonato sódico. El tratamiento se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual, los cristalillos fueron enjuagados con agua destilada, y se dejaron secar a temperatura ambiente.
- Una vez que las placas estaban preparadas para la adhesión, se lavaron los parásitos 3 veces con PBS y se resuspendieron en PBS a una concentración de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml, colocándose 100 µl de esta solución en cada cristalillo, y dejando que se adsorbieran durante 30 minutos en una cámara de humedad a temperatura ambiente. Tras lavar el exceso de parásitos con PBS, se fijaron las muestras en 2% de paraformaldehído (PFA) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución





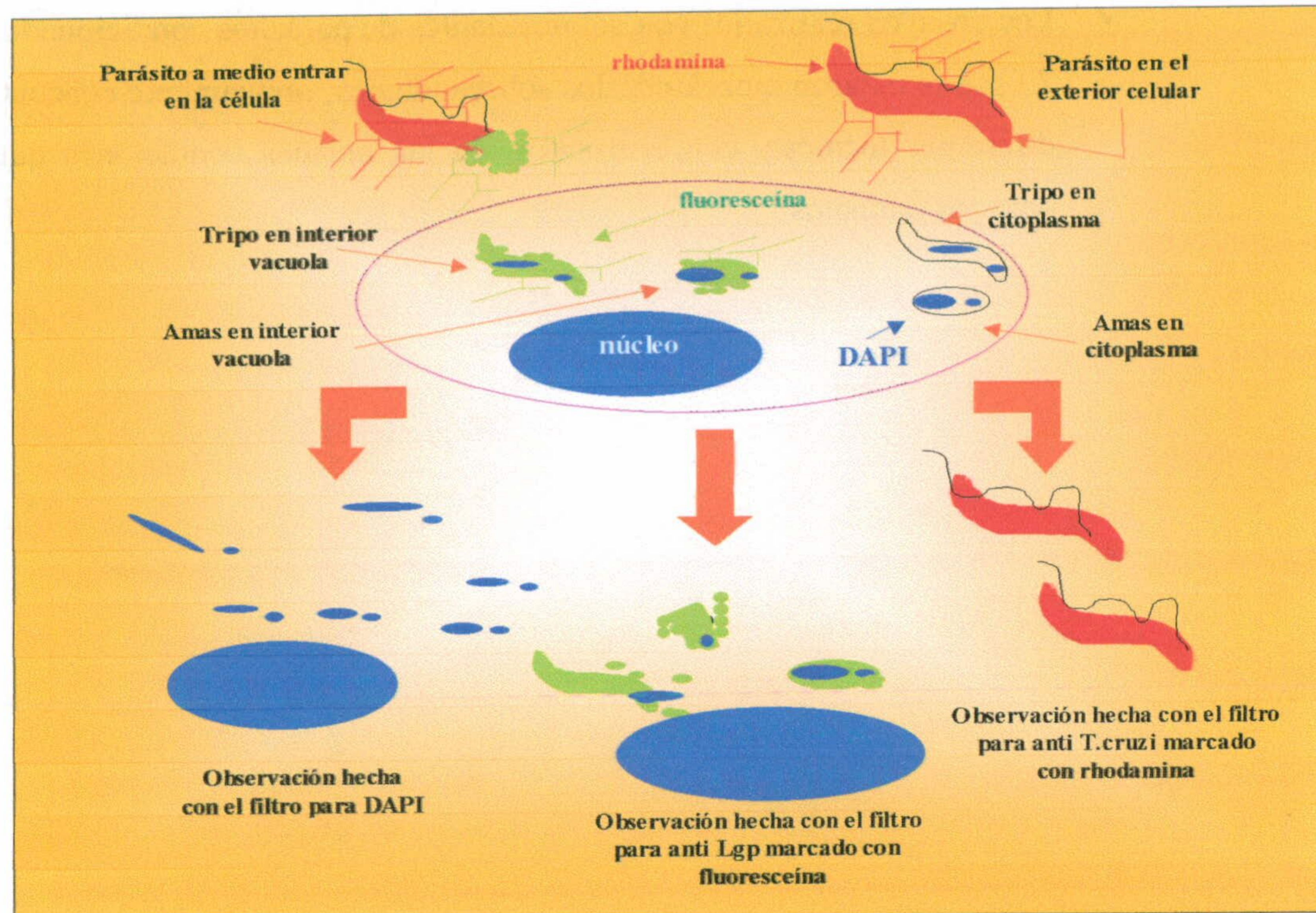
de fijación, las muestras se lavaron en PBS + 1% BSA + 0.025% saponina, o en PBS + 1% BSA, según interesara la permeabilización o no de las mismas, respectivamente. La incubación con el anticuerpo específico de la proteína se realizó con la dilución óptima en las soluciones anteriores, según los casos, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar varias veces con las soluciones anteriores según fuera el caso, se incubó con el segundo anticuerpo conjugado a un fluorocromo (Rhodamina o Fluoresceína, principalmente) a la dilución apropiada (*Molecular Probes*) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo y se incubaron con DAPI (5 mg/ml) diluido 1:200 en PBS durante 1 minuto. Finalmente, después de lavar en PBS, los cristalillos se colocaron en portaobjetos sobre los que se había dispuesto una gota de Mowiol, guardándose las muestras a 4°C y en oscuridad hasta su visualización al microscopio.

➤ ***Caracterización de las invasiones por inmunofluorescencia***

- Para realizar estos ensayos se utilizaron cristalillos redondos de 12 mm de diámetro que fueron tratados con mezcla sulfocrómica (3.6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub>) durante 4 horas, enjuagados con agua y tratados con una mezcla etanol:éter (1:1) durante 2 horas, tras los cual los cristalillos se secaron antes de autoclavarlos finalmente.
- Células NRK fueron sembradas a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> sobre los cristalillos dispuestos en placas de petri de 3.5 cm de diámetro (Nunc), y se mantuvieron en DMEM + 10% SBFi hasta alcanzar la semiconfluencia (48 horas).
- Parásitos metacíclicos fueron purificados de la mezcla con epimastigotes por tratamiento en la solución de Ringer con 1/100 del complemento humano durante 45 minutos a 37°C. A continuación se equilibraron los parásitos en DMEM + 2% SBFi, tras lavados sucesivos, y finalmente se resuspendieron en este medio a una concentración de  $3.75 \times 10^7$  parásitos/ml.
- A continuación se llevó a cabo la infección de las células (equilibradas en DMEM + 2%SBFi) con 400 µl de la suspensión de parásitos anterior



utilizándose una moi de 1:100. Tras dos horas de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, las muestras se lavaron con PBS enriquecido en Ca<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (PBS<sup>++</sup>), y se permitió que la infección continuara o bien se fueron tomando las muestras para cada punto experimental. Cuando este fue el caso, las muestras se fijaron en 2% PFA en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron los cristalillos durante 1 hora, con IgG purificadas de conejo inmunizado con tripomastigotes completos, diluidas 1:1000 en PBS + 1% BSA. Después de bastantes lavados con la solución de incubación sin el anticuerpo, se añadió una dilución 1:400 de IgG de burro purificadas por afinidad y conjugadas con Rhodamina frente a IgG de conejo (*Molecular Probes*), en la solución anterior, y durante 30 minutos. Tras varios lavados, las muestras se permeabilizaron por incubación durante 15 minutos con PBS + 1% BSA + 0.025% saponina. La siguiente incubación fue dirigida a marcar los lisosomas, por lo que las sucesivas incubaciones o lavados se realizaron siempre en la solución de permeabilización. Las muestras fueron incubadas durante 4 horas a temperatura ambiente con una dilución 1:20 IgG de cabra frente a la proteína LAMP-I de la membrana lisosomal de lisosomas de células de rata (*RDX*). Después de lavar varias veces con la solución de permeabilización, se incubaron las muestras durante 30 minutos con una dilución 1:200 de IgG de burro conjugadas con fluoresceína y purificadas por afinidad frente a IgG de cabra (*Molecular Probes*). Tras lavar las muestras, se incubaron con una dilución 1:200 de DAPI (*Sigman*) en PBS durante 1 minuto. Finalmente las muestras fueron situadas en portas sobre una gota de Mowiol. Se dejó que se secaran y se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su posterior análisis en el microscopio.

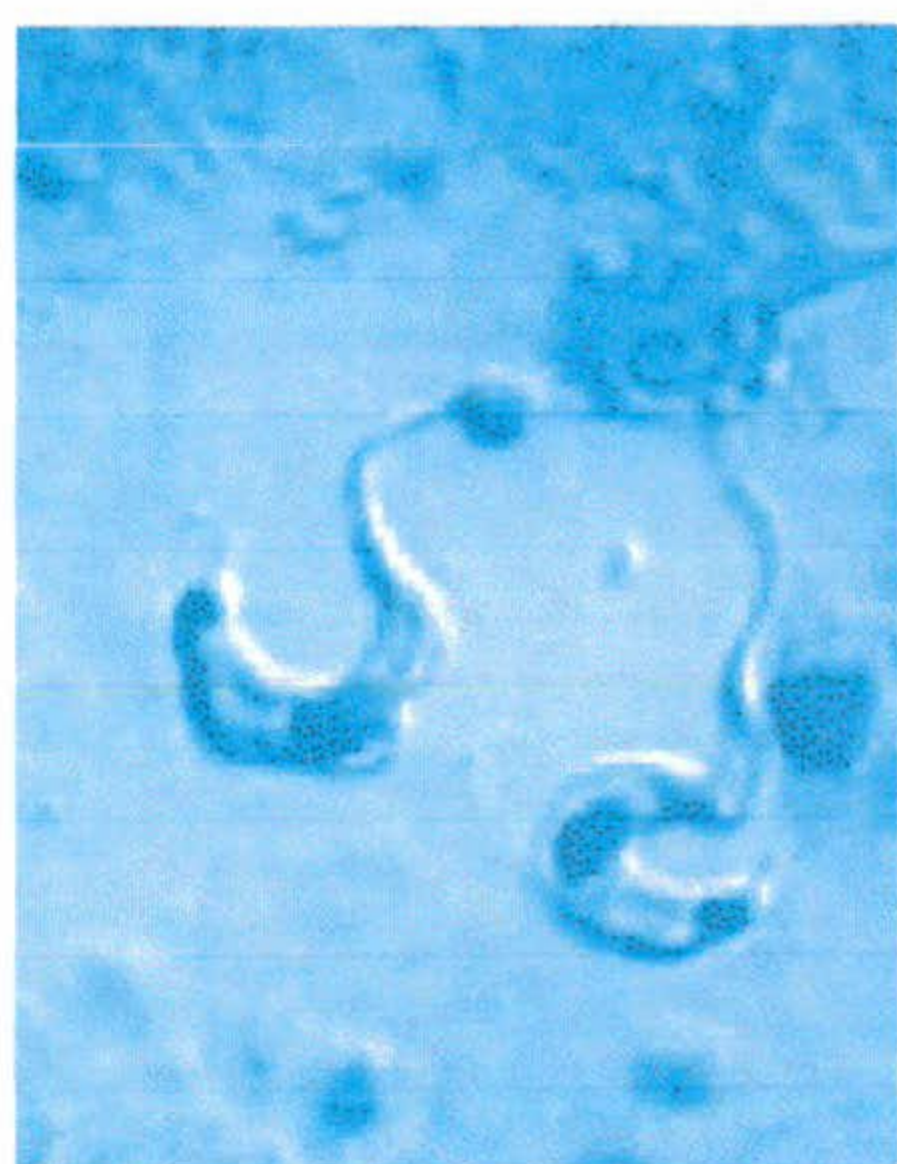


#### IV.2.3.10 *Ensayos hemolíticos*

- ✓ Para llevar a cabo los ensayos hemolíticos se usó el protocolo descrito por Andrews y col., en 1989 con algunas modificaciones. 100 millones de parásitos crecidos hasta la fase logarítmica fueron recogidos por centrifugación, lavados con medio sin suero y equilibrados en medio a pH neutro o ácido (la composición de los medios condicionados se especifica en el apartado V.1.4) en el que finalmente se resuspendieron. En tubos eppendorf, los parásitos resuspendidos fueron incubados durante diferentes periodos de tiempo con 20 millones de eritrocitos de conejo, previamente lavados con PBS y equilibrados con el mismo medio condicionado, a 37°C en un volumen final de 1 ml. Transcurrido este tiempo, las suspensiones se centrifugaron y la hemoglobina liberada al sobrenadante fue cuantificada por medida de la absorbancia a 544 nm. Para la determinación del 100% de lisis el mismo número de eritrocitos (20 millones) fueron incubados en 1 ml de agua durante 10 minutos a 37°C.



- ✓ Los ensayos realizados con sobrenadantes de parásitos condicionados a pH 5.5 o pH 7.0, se realizaron mezclando los sobrenadantes, previamente concentrados utilizando diferentes técnicas, con eritrocitos, en las mismas condiciones que se especifican para los parásitos



# Resultados

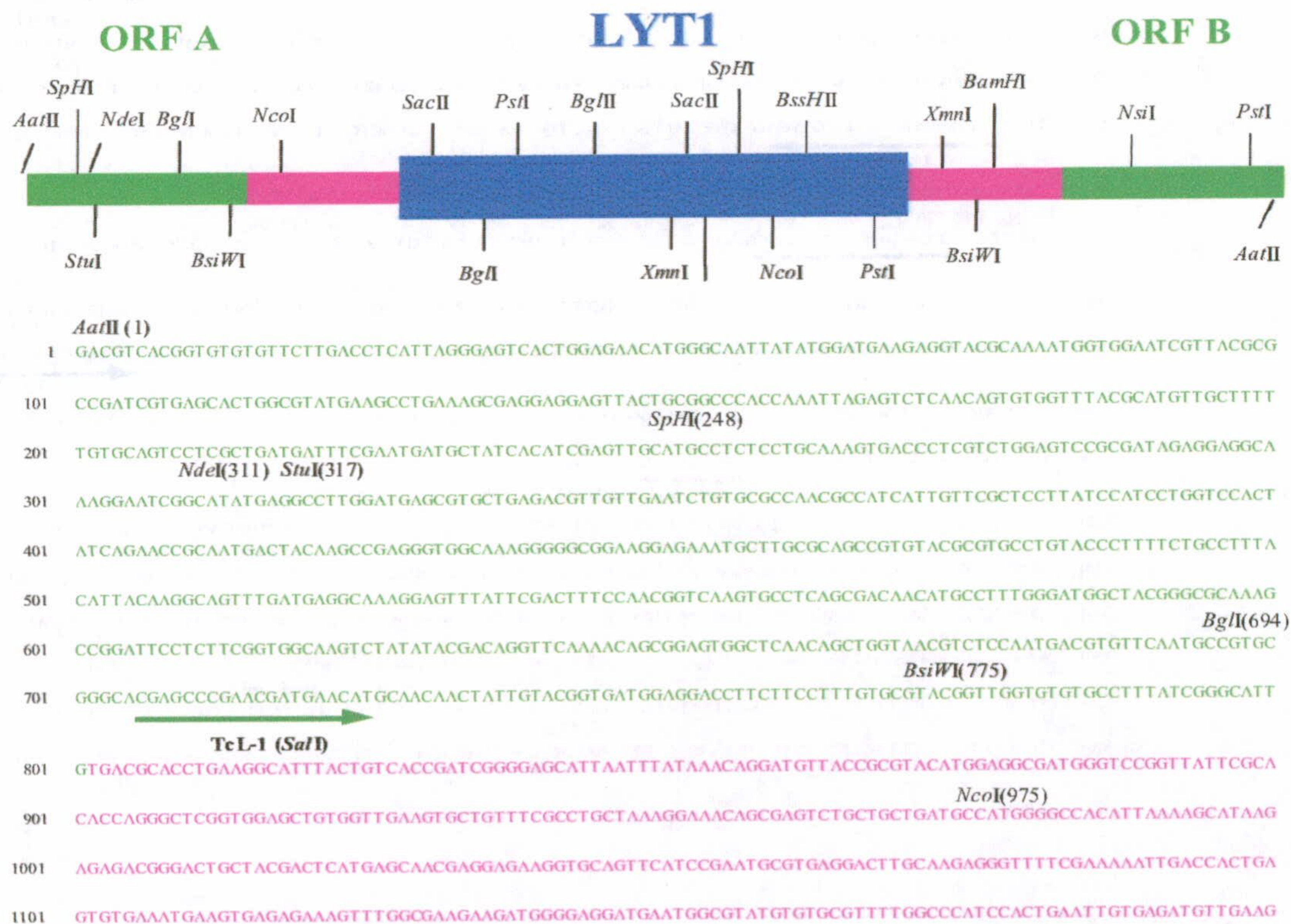


## V RESULTADOS

### V.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN *LYT1*

#### V.1.1 Antecedentes: Aislamiento, secuenciación y organización del gen *LYT1*

El gen *LYT1* se clonó a partir de una librería de expresión de amastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* [Gonzalez, 1990], en base a la reactividad cruzada del mismo con el componente C9 del complejo de ataque a la membrana del complemento. Usando parte de la secuencia de cDNA de *LYT1* como una sonda, se obtuvo el clon genómico  $\lambda$ EMBL-3*LYT1*-20, que, tras ser digerido con diferentes enzimas de restricción, originó un fragmento *AatII* de 5.8 Kb que se subclonó como pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8 Kb.





1201 GGC AAGAGCGAGTCCITTTGCTTTTCATTTTAGCTGTGAGTTTCATCTAAAATGGAAGAAATGACGGAAAGCAAGAGGTGTGGAATTACGCGTATGTATG  
 1301 TCATCCACTCCATCCCTTACGTGCTTCGCACCTTGGCTTTGCTCTGCTTGTGAGTTTCCCTCCTTTTTTTTTTTTGTITGFGCCGTG  
 1401 CTCGCTCTCATGCGGAAGAAAGCCGAGCATTAGCAGCGCCACAGCAGACACCGGCCGACGTGCCGCGGGGTGCCATTGCCAATMAATTATGGAAC  
 1501 GTGCCGGCCCCGTGAGGGCGTTGGGAGATCAACGGAGATGCCGGCTGCTGGACCGACGGGTCTCAAAGAACTCAAACGCACGGGAGGTGAAAGCGTC  
 1601 ACAAGACGCCGACGCGCGGCATTAGTAGTTATTTCCAGTCCGAATTCGTGACATCTCAGTCGCACGAGGGTGTGTCTCCTCTGGCAAAGACTAGGGCC  
 1701 AACGAACGGCGGAACGGGAGCAGGAGCGGGAGAGGAACTGCCGGCGGTTGGTGGCGCGTTCCAACCTGGGAAGGGGACGGACCCCAACAGCGAGTGC  
 1801 TGCAGGATTTGCCAGCGATGCAACGCGGAGGGACAAAACAGCACGGTAGAGAGGGTGACAAGGGTGTTCGGTGAAGATGGACTCCCCTGGTCGCGTACA  
 1901 GGTGCTGGAGCAAATGTTGCTACACCTGGCTGCATTGAACAGACAGCTAGAATTAGAATATAGAAACGCGACGGGAACTGACGATGTACAAGCAGCTT  
 2001 TTACCTGATGTGCAGCGCCAGACCGAGGCCCATGCTTTGTCTCAGGAGCATCACAAAGCGAATAGTGTCTCCGCCACTGATGTGATGAGAGCGGAC  
 2101 GACAGATGCTCTTACAGGGCAACAACAACAGCAACAAGTGGAAAGATCTGCATGGCGGTATTAGCGGGTGGGAAACGGCAGCGAGGAGAATGCGCTA  
 2201 TGGTACGAGGAGGGGAGAGGGACGCCCTTTCAGATGGTGGGGCCGTCACGTTGCGCAGGTCGTATGGGCTCCCGAAGAGATTCTTCAACAACA  
 2301 CCGCTCGAAGCAGCAGGAACCATCGGAACCTCACGCTGCTAACGGGACAAATGGCAATAGTCATGTTCCCATTCGTCCAGACAAAAGTCAACCGA  
 2401 CAAGAGGAGCTGCTGTACTTCCGTACCGTTGGCGGCGTCCGCAACCAATCGCCGAGGTCGTCCATGCGACAACTACCCGACCCCGCGGACCTCTTA  
 2501 TCTTTTCGAACGCTCGACGCTGAGGATGCMAATGATATGCTGGAGACGCTGAAGCGCTCTCATGTATCGCTGCAACCACTCGCATCATCGATCAACA  
 2601 GAAGGAGATGTTGTGCGGCCCGCCGCGAAGCCCGGAAGGCACGCGGCTGTGTCCACCAACCACCGCCACCACCGCCCATGTGATCATCGTCAACAAAGAA  
 2701 AGCTTGCCGCCGAGTGTGCTGGAGCGCCGCGATGCAGCGTCTCAGCACGACACGGAAGGAACCATGGCGTTCTGCGGTGGGAGATCGTCAAGGGGCAA  
 2801 TCGAGTTTCAGAAACAGCTCGCATAGCTCATGCTCCTCTTTTGGGGGAAGAAATGCGCGCCGGGCTAACCAACTCCATTTCTCTCCCCTTCCAGA  
 2901 AAGGCTACGCCGATGAAAAAGACACGCCATTGTACGTTGGTCAAGCGGCTGGAGTAGCAAGAGTACGCGGTGGCGGTGACGGGCAGCTAGAGGCCACTGC  
 3001 AGAGGCGTACTGGGAACAGTCCCCTGCGATATTGGAGCAGCTTGAACATGCTGGCAGCTGATGGAAGTCTTTGGCATTAGGGATGACAAATCATAATC  
 3101 GTTTTGACGCTTCGTTGAGGTTGGTACATTCTGAGAATTGTATCTGCACAGGGTGCAGTATACACACACACACACACAATAACATGTACTACTATGT  
 3201 TGTGCTATCTACCAGGAGGGGTGACGAGTGAAGTGAATGAGCAAGCGGGTGAAGTTTCTTCTCACAGTCTCCCGCGACGCGAAGAGCAGGAGA  
 3301 ATGGAAGTACAATGCGAGAAGAAGAGAAGAAAGAAAAAATAAGAGGAAGTAAATGACGTTTCGAGCGTGGTTAAGCATACCTTGAGGACA  
 3401 CTGAACAGATAACAAGCACAAGGTACAGAAAATGAACGGGATTGGGTAAAGAAAGAAATGAATAGACGACAGAGAGAGAAGTATGAGAGAATGAGG  
 3501 GAGGGAATAGGGTGAATAGAGGGGTGAAGCAGCGTTGCATTCAGCCGATGTGAAACAAATGGGAGAGCCAAAATTTTTTTTGTGTAATTTTCGT  
 3601 TTTGTGTGTCGTTTTTTTTCATTTTCGTTTTTTTAGAGGTATCGTCTCTTCCGTCAGGCATGTGGATCCTGTTCTGTTCTCTCTCTCGCTCGCT  
 3701 TCTCTCACGCTTTTTTTTTTTTCTAACCCATTCAACACACACACACACAAATTTCTGTCCTTACCCTGCTGTTGTGATTGTTGTTCCCTC

**Artx-8 (BamHI)** →  
**Artx-5 (BamHI)** →    **TeL-3** →  
**BglII(1610)** →  
**LYT1 (BamHI)** →  
**LYT1-2** ←  
**POR-4** →  
**EGR-2** →  
**BglII(2150)** ←  
**LYT1-3'** ←  
**TeL-2** ←  
**XmnI(2281)** →  
**LYT1 tr (BamHI)** →  
**SacII(2481)** →  
**TeL-5** →  
**HindIII(2703)** →    **SpHI(2732)** →    **NcoI(2764)** →  
**TeL-6** →  
**BssHII(2859)** →  
**PstI(2999)** →  
**TeL-7** ←  
**Artx-6 (EcoRI)** ←  
**XmnI(3256)** →  
**BsiWI(3664) BamHI(3668)** →



```

3801 TCTTTTTGGAGGCCATGATTTTCCCATGTTT TTTT TTTT GATTGACTTCTCTCTTCATTCGTATTTGTTTTTCTCCTTTGTGCCACCCC
                                     ← Artx-1
3901 TCCGGTGTGAGTGGCCCGCCGGCGAAAGGGGAGGGGGCGACAGAGAGGAAGGCGGTTCTAATTTGTTTTAAACAGGGTGTCTTCTACCAAT AAGAGG
4001 GGAAACAATAAGGAGAGGATAGCGGAGCAGGGATGGTTCCGGGTGCGCGGTGTCGAAGGAGACGCGGGAGATGTGCGGCAACGCAGGGCAGAGTTAA
                                     ← EGR-1
4101 TCCGGAAGGTTGGACGAGGAGAAGCGGCAGCTGCGCGGTGCTGGGTGACGGACAACAATGCGCTTCAAATGCAGAGGCTCGCAACGCGAACAGTTG
                                     ← TcL-4 (XbaI)
4201 CAGCGTCATGCCCGAGGCGTGTGCACGTGTAATCTTTTACAAATTGGAAMAGACAGACACGGGGCTGGTGCTTGACGACCCGCGAGGTGCGCGACC
4301 GCGTCACGCAGGACGACATGTTGGCTGCTGTAGACCTTCAAACACAGGAGAAGAGTATGAGCTGCTGCTGGATAAGTTAGGCCCGTACAAGGTGGACTT
4401 CTCCTTAAATGGCACTCATCTTCTTCTCGCAGGGATGCGGGGACACGTAGCAATATTGCTGGAAGGATTTGCGCTCAACGGCGAGGTGCAGCTGAAG
                                     NsiI(4599)
4501 GATCGGGTCGATGATGCCAAGTTCCTCGTTGATCACACTATGACGGCGCTGGCGCAAAAGAAATATGTTTACATGTACACCAAGGAAGGGTCGGAGATGC
4601 ATATCTTTCTAAAATGGCAAACATGGACCGACTGGCGTATCTGCCACGGCACTTGTCTTGGCGAGCCTCTACTCGTTTCAAGTGTATGCAATACAT
4701 GGACATCAGCACAGGGCAGGAGCTGGGTGCAAAGGTGCCCTCTGTGGTGGAGACCCTACCTCCTGCATGGATGTCAATCCGAGCAATGGGGTGATAGCG
4801 AGCTGTGATTTGCGTGGTGTGGTGAAGTTTTGGTCTCCAGTTGTGTTAGACCCACTTGTGCAACTCAAGGGTCACAAGGGCGTCATTGACGACATCCGAT
4901 TTCATCAAATGGCGATTTTTTGGGTGACAACCTTGGGTGGGGATCAACAAAATTTAGGTCGTTGGGACTTGTCCGCACACTGCGTGCCTGGAGGAGTA
5001 CGCCGTGACGTACACCTTCAACACCATCGACATCTCTAGTCCGGCCTCGTGGCTATGGGGGGTGGCACAAATGTGCAGTTGTGGAAAGGCATCTTTCC
5101 AGTGCCAAGCCAACGGCACCGTATATGAAGTTGGACTTGGCTATGGTAATATTGCCACAGAGGTGCGATTCTGCCATTGAGGATGTGTTGGGCATCG
5201 GTCACTCCCGTGGCTTTCAGTCGATGCTCATCCCTGGCGCCGGGACGCGAATCCGGACTTTTTCTACGCCAATCCACACGAGACGGAGAGGCCACCGGAA
5301 GGAGCGCGTCGTGTCAACGCTGCTAGACAACCTGCCGCCGACACCATTTCCCTTGACATTCAGGTCCTGGTGTCAACGAGGCGCGGCTTGACAGAGTAT
                                     PstI(5499)
5401 AATGAAAATATACGCCTTAATCGAAAGGCGAGGGCTATTCGCGAAAAGAAGCAACGTGGGGCGGACAAGTCTTGGCCGACGCGCCCGACTGGACTGC
5501 AAGTGGCAATGACGATGAGGTGGACGAGGATATTGGCTACTGGGAGCGTCCAGCGACGCGGGAGCTAAAGTCTAGGAAGGAGAAGCTGAAGGAGCGGAA
5601 GATGCAGAAAGTGGGACAAGAAGGACAGCTCGGACAAGTACGGTCAAAGCAGACCATGCGCACCTCCAAGATTGCGCAACAGCGCGGGGCAAAAGTCCGG
5701 CGAGCGGGCCCGCTGACAAGAACGAGGAAGAGAGGGAGGAGGAGAAGGGGGAGCGGAAGAGAACGCAGAGTCAACTCAAGAACGTCGGCGCAGGAGG
                                     AatII(5816)
5801 CTGTATATGCCCGGACGTC

```

**Figura V.1.-Secuencia completa del clon pGEM5Zf(+)-LYT15.8.** En la parte superior aparece representado esquemáticamente el clon, mostrando en verde las zonas codificantes ORFA y B, en rojo las regiones intergénicas y en azul el gen *LYT1*. También se muestran los principales sitios de restricción y las regiones de hibridación de los cebadores utilizados en las distintas construcciones.

El inserto de 5820 pb del clon contenía tres zonas codificantes en la misma orientación: una primera fase de lectura indicada en la figura VI.1 como ORF A de 802 pb, que carece del extremo 5'; la secuencia codificante del gen; y una tercera señalada como ORF B de 1781, a la que le falta el extremo 3'.

Análisis genómicos utilizando diversas enzimas de restricción y realizando hibridaciones con sondas apropiadas indicaron que se trataba de un gen de copia única de 1656 pb que codifica una proteína de 552 aminoácidos. El estudio de la localización del gen mediante la técnica de





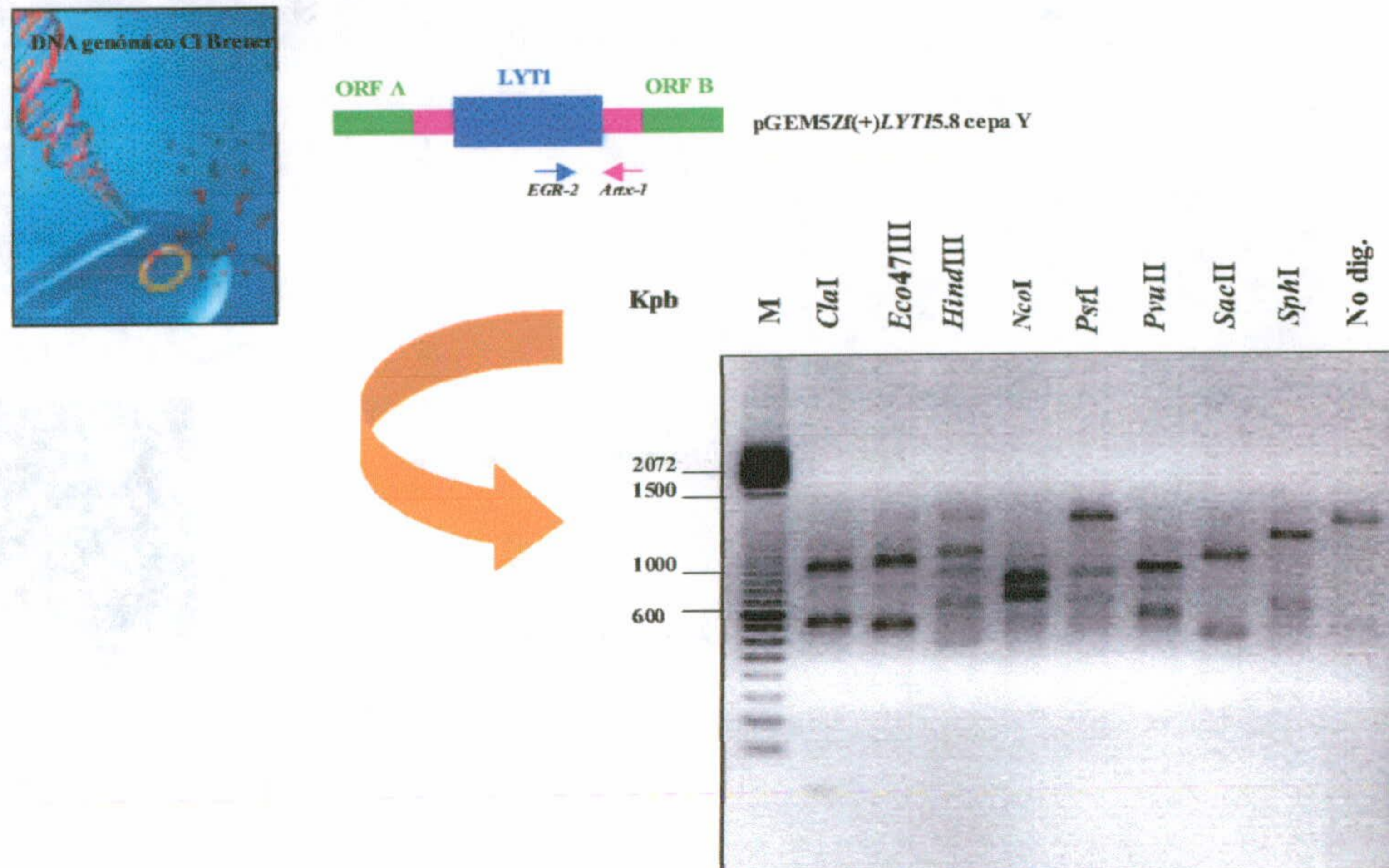
*blot* cromosómico mostró que las copias alélicas del gen *LYT1* se localizaban en los cromosomas VI y XII, de tamaños respectivos 1.60 y 1.03 Mb.

### V.1.2 Análisis molecular de los alelos del gen *LYT1*

Estudiando el alineamiento de la secuencia parcial de cDNA con la parte correspondiente del DNA genómico, se observó que existían una serie de diferencias en la región codificante. Ya que diferencias de este tipo pueden ser debidas, entre otras causas, al hecho de que los DNAs correspondan a copias alélicas diferentes, uno de los objetivos de este trabajo fue completar el análisis de los alelos del gen. Aunque el gen se aisló en un principio en la cepa Y de *T. cruzi*, todos los estudios y experimentos realizados, incluyendo el aislamiento de las formas alélicas, se realizaron en la cepa Cl Brener, por ser la cepa de uso común en los grupos que han colaborado en el estudio de este gen.

#### V.1.2.1 Clonaje de los alelos *LYT1a* y *LYT1b*.

Para estudiar las posibles diferencias entre alelos se realizó en primer lugar un análisis de restricción del DNA genómico en la cepa Cl Brener. Para ello se llevó un análisis de restricción de un fragmento amplificado por PCR usando como cebadores EGR-2 (localizado en la región 3' del gen) y Artx-1 (localizado en la región 3' flanqueante), y tomando como molde el clon pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8 Kb. El análisis, que se muestra en la figura V.2, dio lugar a fragmentos de tamaño discordante respecto a los valores esperados según la secuencia conocida del clon.



**Figura V.2.**-Análisis de restricción del fragmento amplificado por EGR2/Artx1. El producto de amplificación fue digerido durante 2 horas con diferentes enzimas de restricción, analizándose el resultado a través de la separación en un gel del 1% de agarosa.

Se realizó entonces un *Southern* genómico en el que se utilizaron parásitos del tipo salvaje y parásitos, en los que al realizar experimentos de sustitución génica, había quedado retenida una de las dos copias alélicas (Apéndice I). El DNA purificado de epimastigotes fue digerido con diversas enzimas de restricción, separado electroforéticamente en un gel del 1% de agarosa y transferido a una membrana de nylon. La membrana fue hibridada con una sonda de la zona 5' del gen *LYT1* derivada de la secuencia del clon pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8 Kb, que ocupaba desde la posición 392 a la 672 de la pauta abierta de lectura del gen. La sonda se obtuvo con los cebadores POR-4 (complementario a la secuencia desde el nucleótido 392 al 411) y LYT13' (complementario a la secuencia desde el nucleótido 648 al 672). Tras la exposición en placa autoradiográfica se observó un patrón de restricción que mostraba que uno de los polimorfismos entre los alelos estaba en el sitio *PstI*, y esta diferencia se tomó como criterio para distinguir ambos alelos (figura V.3)

*R*

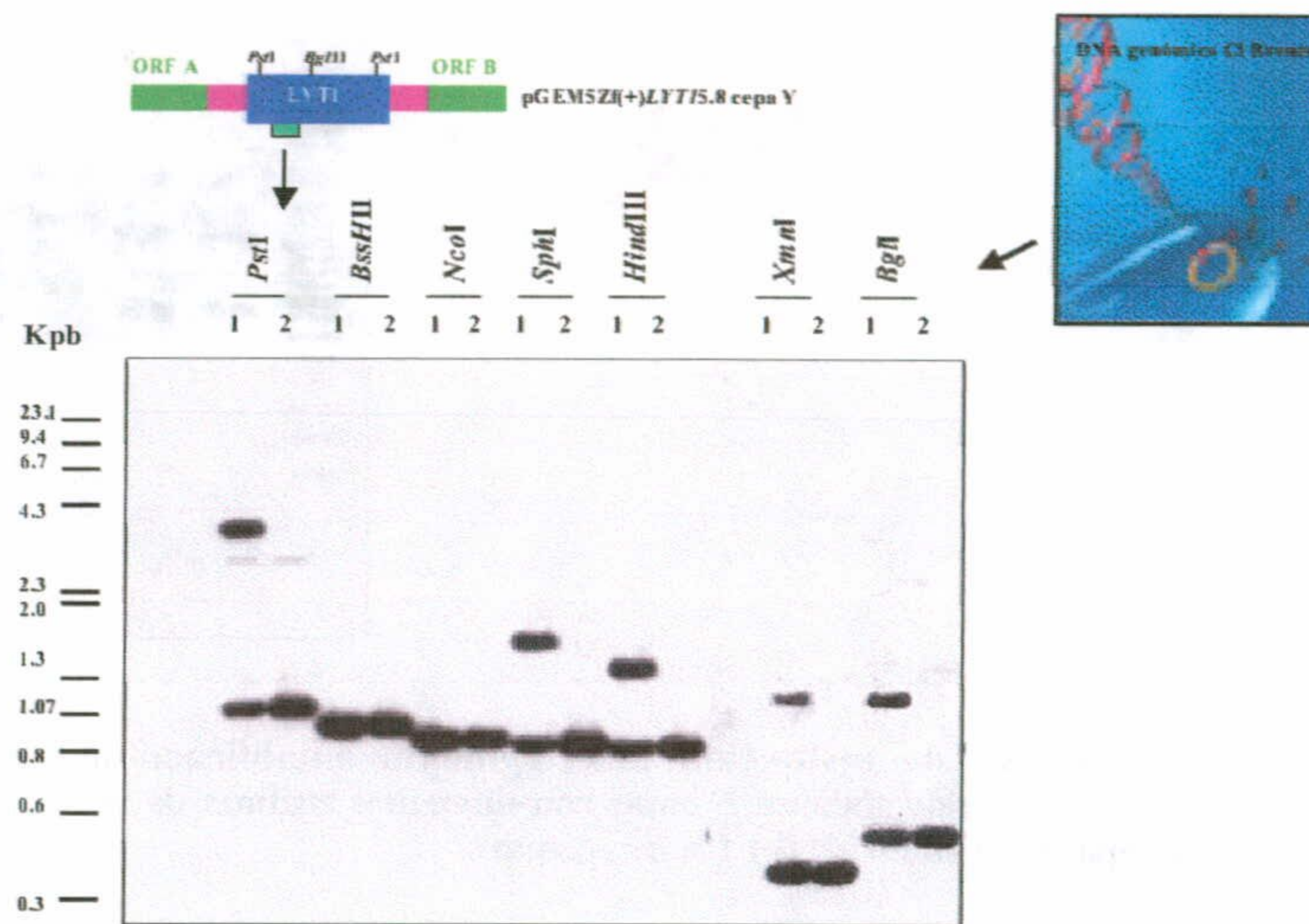


Figura V.3.-Análisis genómico en *Southern blot*. DNA genómico de epimastigotes de la cepa CI Brener de *T. cruzi* fue digerido e hibridado con una sonda de la región 5' del clon pGEM5Zf(+)-5.8 LYT1. Carril 1, parásitos salvajes; carril 2, parásitos que retuvieron una de las dos copias alélicas del gen, tras el proceso de obtención de mutantes nulos.

La viabilidad del sitio *PstI* como elemento utilizado para diferenciar los dos alelos se confirmó realizando un *Southern* genómico utilizando DNA de parásitos de tipo salvaje, del mutante simple, y de mutantes nulos (en los que se habían sustituido ambas copias alélicas).

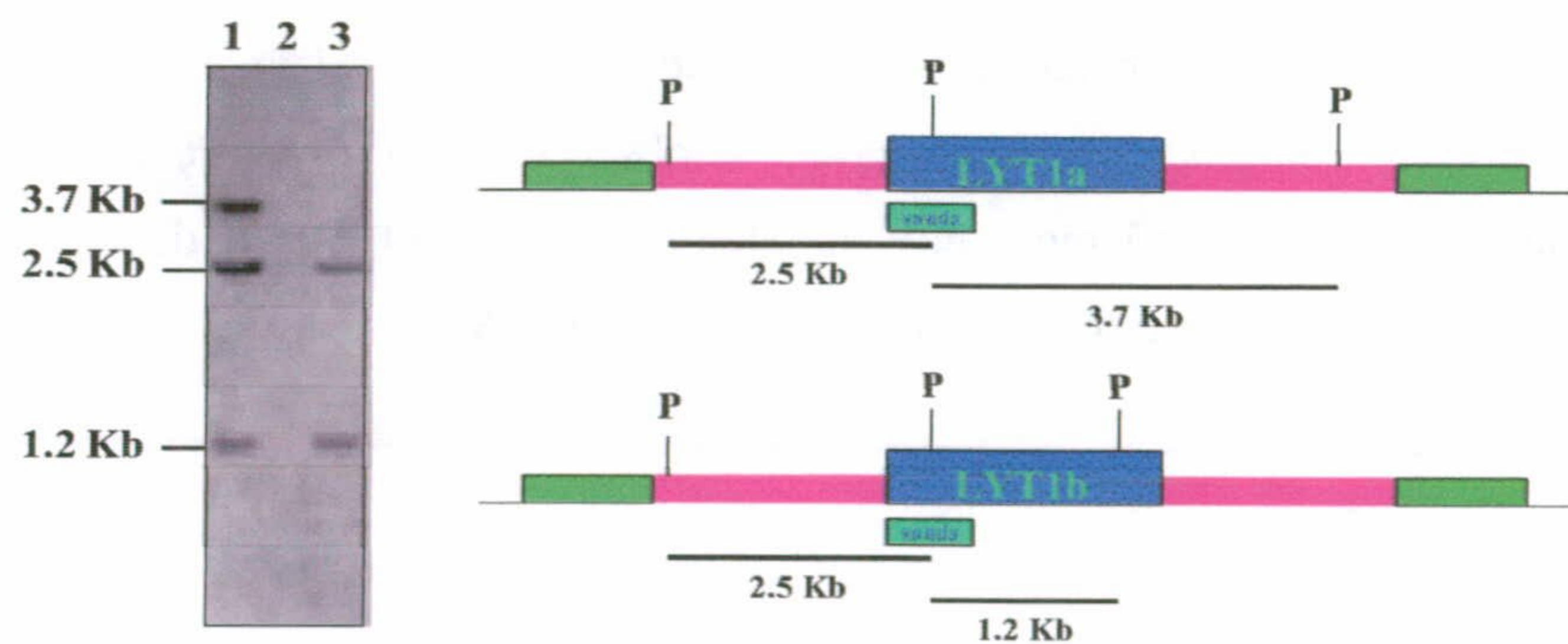
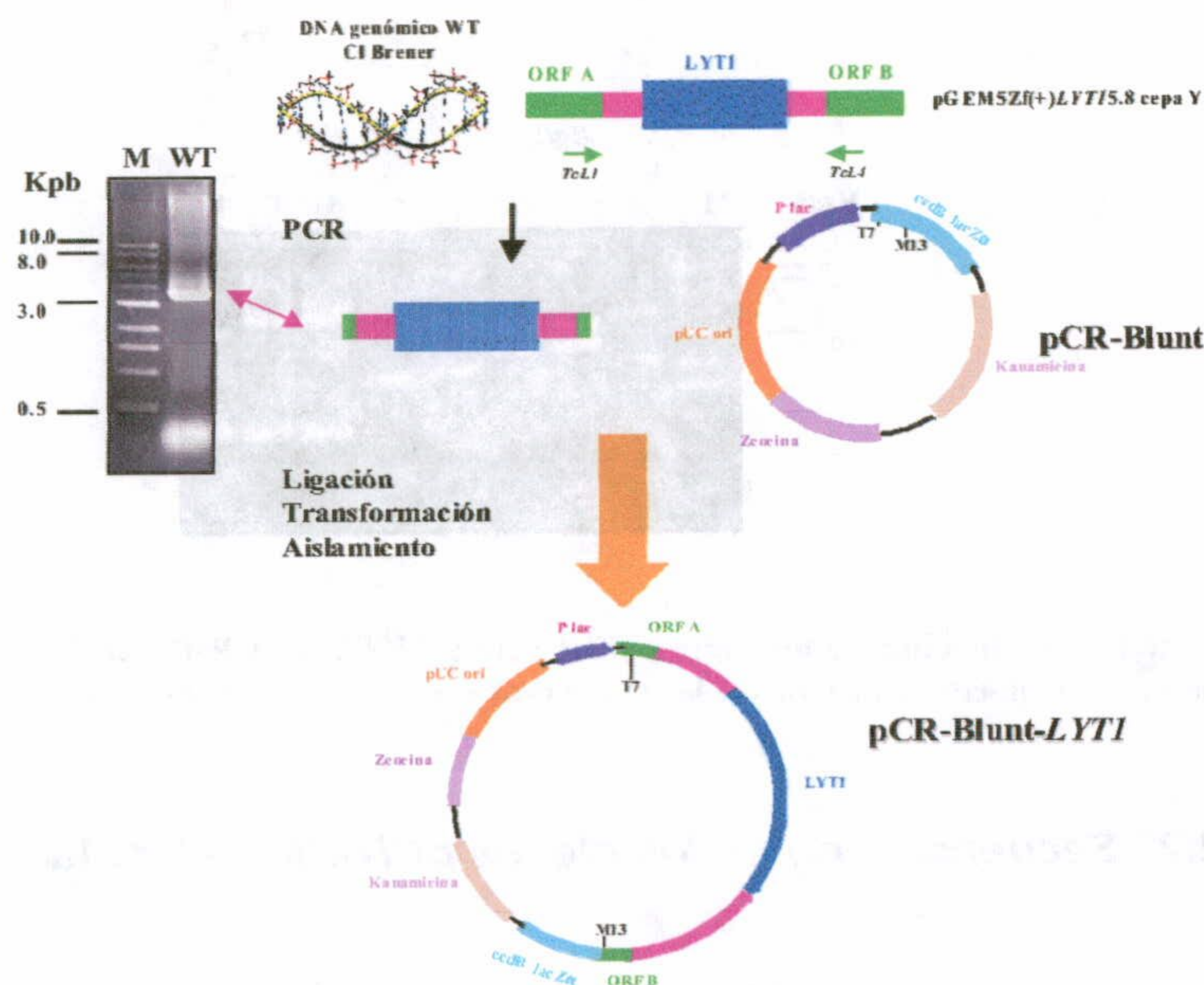


Figura V.4.-Comparación del sitio *PstI* entre las copias alélicas del gen *LYT1*. Análisis genómico en *Southern blot* de la cepa CI Brener del tipo salvaje (carril 1), el clon L16 mutante nulo (carril 2), y el clon 14 mutante simple (carril 3). Al lado del gel se muestra el mapa de restricción para el sitio *PstI* del loci de los alelos a y b de *LYT1*. Los fragmentos de restricción que hibridan con la sonda son del tamaño esperado, lo que indica una correcta integración. En el mutante nulo no ocurre ningún tipo de hibridación lo que indica que ambos alelos habían sido reemplazados.



En la figura V.4 se muestra de forma esquemática la denominación de alelo a o b dependiendo de la ausencia o presencia, respectivamente, del sitio *Pst*I en la región 3' de la zona codificante del gen. El resultado del *Southern* indicaba cuando menos la existencia de polimorfismos en el loci del gen, por lo que se decidió realizar el clonaje de ambos alelos para estudiar la base de las diferencias observadas. Usando la secuencia del clon pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8, se diseñaron los oligos TcL1 y TcL4, localizados en las regiones ORF A en la zona 5' del clon y ORF B en la zona 3', respectivamente. Utilizando DNA genómico de parásitos salvajes de la cepa CI Brener, se llevó a cabo la reacción de PCR (figura V.5) con las siguientes condiciones: 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a 62°C y 3.30 minutos de polimerización a 72°C, durante 30 ciclos. El producto de PCR se purificó del gel mediante *Gene clean*®, se precipitó y se ligó directamente al vector pCR®-Blunt (*Invitrogen*) durante 1 hora a 16°C.



**Figura V.5.-Clonaje de los alelos *LYT1a* y *LYT1b*.** Etapas implicadas en el clonaje de los dos alelos del gen *LYT1* en el vector pCR-Blunt utilizando DNA genómico de parásitos salvajes de la cepa CI Brener.

Se transformaron células competentes TOP10 y se aisló DNA de los clones recombinantes mediante el Kit Wizard Miniprep de *Promega*. A continuación, y como se muestra en la figura V.6, se confirmó la presencia y orientación de los insertos así como la posibilidad de



que fueran uno u otro alelo mediante la digestión con las enzimas *Bgl*II y *Pst*I, respectivamente, y en base a la secuencia conocida del clon pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8 (figura V.1).

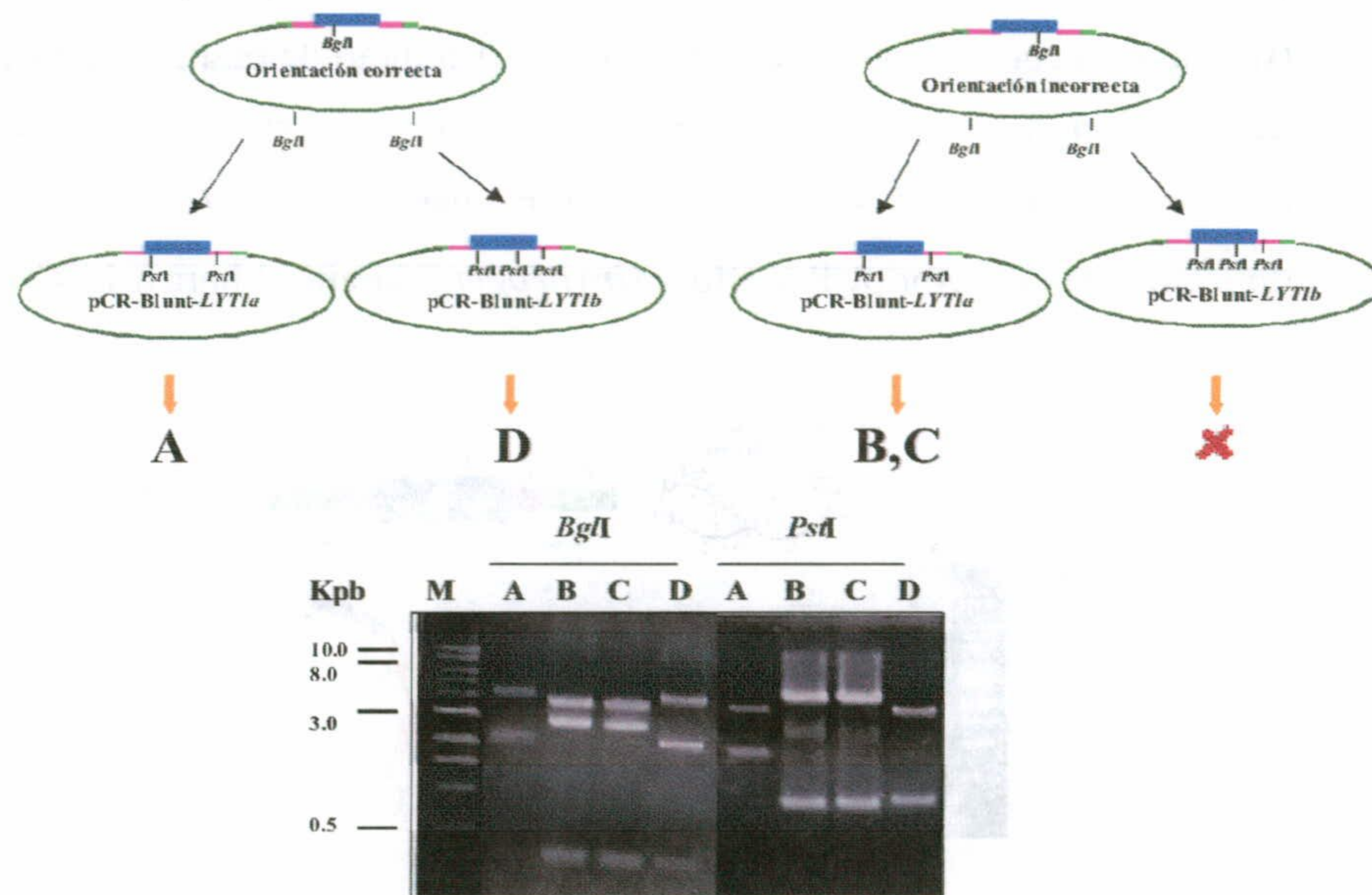


Figura V.6.-Obtención de los clones pCR-Blunt-*LYT1a* y pCR-Blunt-*LYT1b*. Los clones resistentes se aislaron y se digirieron para conocer la presencia de insertos, su orientación y el tipo de alelo.

#### V.1.2.2 Secuenciación de los clones pCR-Blunt-*LYT1a* y pCR-Blunt-*LYT1b*

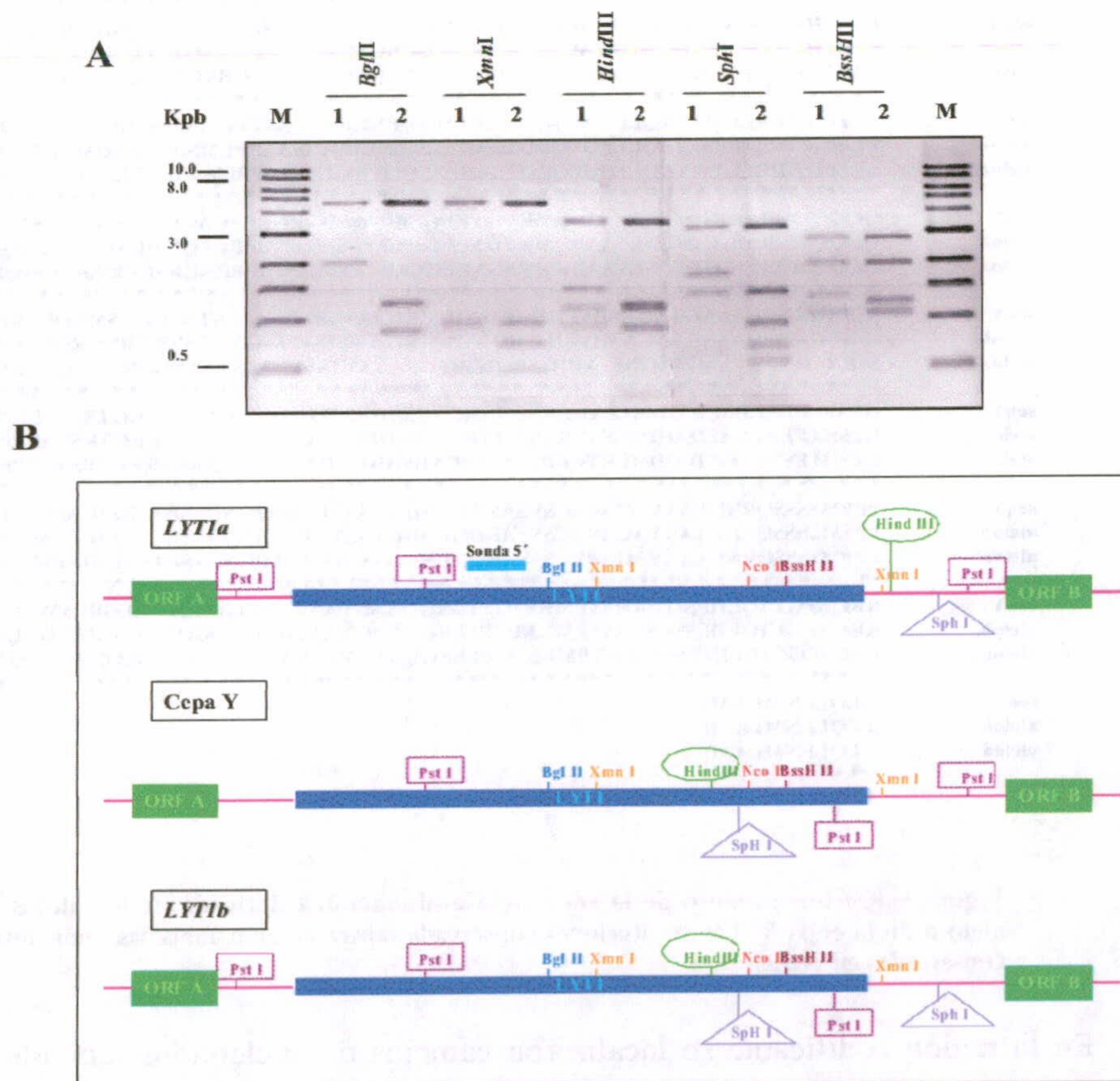
Con el fin de obtener la secuencia completa de los insertos de ambos clones, se secuenció, según las condiciones descritas en material y métodos, en primer lugar con los cebadores universales T7 y M13. Éstos corresponden respectivamente a las zonas 5' y 3' de la secuencia del vector inmediatamente previa a los insertos. A continuación, se diseñaron una serie de oligos (TcL3, POR4, TcL2, TcL5) que permitieron avanzar en ambas direcciones en la secuencia de cada inserto (figura V.1). Todas las secuencias obtenidas fueron editadas y procesadas para realizar los solapamientos correspondientes. El conjunto de solapamientos de las secuencias obtenidas permitió armar la secuencia completa de cada inserto correspondiente a los alelos a y b del gen *LYT1*. El clon pCR-Blunt-*LYT1b* contenía la secuencia codificante del gen, 200 pb de la región ORF A y 432 pb de la región ORF B. A su



vez, el clon pCR-Blunt-*LYT1a* contenía la región codificante del gen, 276 pb de la región ORF A y 60 pb de la región ORF B. Los números de acceso en el *Genebank* de la secuencia nucleotídica para pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8, *LYT1a*, y *LYT1b* son AF253317, AF263616, y AF320626, respectivamente.

### V.1.2.3 Análisis de la secuencia de los alelos *LYT1a* y *LYT1b*

Una vez obtenidas las secuencias de ambos alelos, se procedió a un análisis de restricción de los clones utilizando las enzimas que los habían diferenciado anteriormente. El resultado se muestra en la figura V.7A. En la figura V.7B se representa esquemáticamente los sitios de restricción comunes y diferentes entre las secuencias de ambos alelos y la del clon pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8.



**Figura V.7.** Comparación de los clones pCR-Blunt-*LYT1a* y pCR-Blunt-*LYT1b*. A través de análisis de restricción se determinaron las diferencias existentes entre las secuencias de los clones aislados entre sí y con el clon pGEM5Zf(+)*LYT1*5.8. En la figura A, carril 1, pCR-Blunt-*LYT1a*; carril 2, pCR-Blunt-*LYT1b*.



El alineamiento de las secuencias correspondientes a la pauta abierta de lectura del gen de ambos alelos entre sí y con la secuencia del clon pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8 se muestra en la figura.V.8.

seqY	MRKKAALAAPTADTRPTCRGAAIANKFMERAGPREGVGRSTEMPAAGPTGSQRTQTQRE	60
alelob	MRKKAAL VAPTADTRPTCRGAAIAN NFMGRAGPREGVGRSTEMPAAGPTGSQRSQTQRE	60
aleloa	MRKKAAL VAPTADTRPTCRGAAIAN NFMGRAGPREGVGRSTEMPAAGPTGSQRSQTQRE	60
seqY	VKASQDADAAAISYFQSELVTSQSHEGVSP LAKTRANERRNGEQEREKELPAVGGAVPT	120
alelob	VKASQDADAAAISYFQSELVTSQSHEGVSP LAKTRANERRNGEQEREKELPAVGGAVPT	120
aleloa	VKAS K DADAAAISYFQSELVTSQSHEGVSP LAKTRANERRNGEQEREKELPAVGGAVPT	120
seqY	GKG TDPKQ RVLQDLPAMHAEGQNQHGREGDKGVS VKMDSPGRVQVLEQMLLHLAALNRQL	180
alelob	GKG TDPKQ RVLQDLPAMHAEGQNQHGREGDKGVS VKMDSPGRVQVLEQMLLHLAALNRQL	180
aleloa	GKG TDPK R V L Q D L P A M H A E G Q N Q H G R E G D K G V S V R M D S P G R V Q V L E Q M L L H L A A L N R Q L	180
seqY	ELELIE TRREL TMYKQLLPDVQRQTEAHALSQEHHKANS AAPPLMSDERRRQMLFTGQQQ	240
alelob	ELELIE TRREL TMYKQLLPDVQRQTEAHALSQEHHKANS AAPPLMSDERRRQMLFTGQQQ	240
aleloa	ELELIE TRREL TMYKQLLPDVQRQTEAH A S S Q E H H K A N S A A P P L M S D E R R R Q M L F T G Q K Q	240
seqY	QQQQVEDLHGGISGWETAARRMRYGYEEGERDALS DG EGRPRCAGRMSGPKRFLSTQPPR	300
alelob	QQQQVEDLHGGISGWETAARRMRYGYEEGERDALS DG EGRPRCAGRMSGPKRFLSTQPPR	300
aleloa	QQQQ A E D L H G G I S G W E T A A R R M R Y G Y E E G E R D T L S D G E G R P R C A G R M G S P K R F L S T Q P P R	300
seqY	SSRNHRNPHAANGTNGNSHVP HSSRQKSHPTRGAAVTSVPLAASATNRRGRSMRQHTRPR	360
alelob	SSRNHRNPHAANGTNGNSHVP HSSRQKSHPTRGAAVTSVPLAASATNRRGRSMRQHTRPR	360
aleloa	SSRN Y R N P H T A N G T N G N S Y V P H S S R Q K S H P K R A A A V T S V P L A A S A T N R R G R S M R Q H T R P R	360
seqY	GPSYLFERLDAEDAIDMLETLKRSLMYRCNHS HHRSTEGDVVRPAAKPRKGRTRSVPPPPP	420
alelob	GPSH L F E R L D A E D A I D M L E T L K R S L M Y R C N H S H H R S T E G D V V R P A A K P R K G T R S V A P P P P	420
aleloa	GPSH L F E H L D A E D A I D M L E T L K R S L M Y R C N H S H H R S T E G D V V R L A A K S R K G T R S V P P P P P	420
seqY	PPPMSSSSQRKLA AAVAGAPACSVSARHGRNHGVS AVGDPSRGNRVSETARIAHAPSF GG	480
alelob	PPSM L S S S Q R K L A A A V A G A P A C S V S A R H G R N H G V S A V G D P S R G N R V S E T A R I A H A P S F G G	480
aleloa	PPPMSSSSQRKLA AAVAGAP V C S V S A R H G R N H G V S A V G D P S R G N R V S E T A R I A H A P S F G G	480
seqY	KKCAPGLTQLHFSSPSRRATPMKKDTPLSRGQAAGVA AVAVGGDGQLEALQRRYWEQSRA	540
alelob	KKCAPGLTQLHFSSPSRRATPMKKDTPLSRGQAAGVA AVAVGGDGQLEALQRRYWEQSRA	540
aleloa	K N C A P G P T Q L H F S S P S R G A T P M K K D T P L S R G Q A A G V A A V A E G G D G Q L E A L Q R R Y W E Q S R A	540
seqY	ILEQLENMLAAD	552
alelob	ILEQLENMLAAD	552
aleloa	ILEQLENMLAAD	552

Figura V.8.-Alineamiento de la secuencia aminoacídica derivada de los alelos *LYT1a*, *LYT1b*, y del alelo a de la cepa Y. Las sustituciones conservadas aparecen en naranja, las semiconservadas en rosa, y las no conservadas en verde.

En la región codificante se localizaron cambios de nucleótidos individuales, respecto a la secuencia del clon de la cepa Y, que originaban cambios en la secuencia de aminoácidos traducida que parecían concentrarse preferentemente hacia la zona 3' del gen. En el alelo *LYT1a* más de la mitad de los cambios en la secuencia eran sustituciones de aminoácidos conservadas, 24% eran semiconservadas y 24% de las sustituciones no estaban conservadas. En el alelo *LYT1b* la proporción de sustituciones de aminoácidos conservadas, semiconservadas y no conservadas fue la misma e igual al 33.3% en cada caso, respecto al



total de cambios en la secuencia. Por tanto, la identidad entre las secuencias aminoacídicas de *LYT1b* y *LYT1a* es del 84%, entre *LYT1a* y el clon pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8 del 79%, y entre *LYT1b* y el clon pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8 del 82%. Con estos datos se consideró que las diferencias observadas entre los alelos no eran significativas y se procedió a estudiar la secuencia aminoacídica del alelo *LYT1b*.

El peso molecular teórico estimado de la proteína es de 59.836 KDa, y el punto isoelectrico es de 10.31. Utilizando el programa de análisis PROSITE, se localizaron una serie de sitios con posibilidad de sufrir modificaciones, tales como amidación, miristilación, fosforilación por proteína quinasa C, fosforilación por proteína quinasa dependiente de GMP cíclico y AMP cíclico, N-glicosilación, fosforilación por caseína quinasa II, así como regiones significativas ricas en glutamina. De forma esquemática se muestran en la figura V.9 los potenciales residuos que podrían verse afectados por estas modificaciones. Respecto a los sitios de fosforilación más adecuados, utilizando NetPhos 2.0, parece que existen 29 serinas y 13 treoninas susceptibles de sufrir procesos de fosforilación, mientras que ningún residuo de tirosina lo es.

Utilizando el programa PSIGNAL (PCGENE), se observó la existencia de un posible péptido señal de 15 aminoácidos, lo que indicó que *LYT1* es una proteína potencialmente capaz de ser secretada. Por otro lado, utilizando el programa SPORT, se observó la existencia de diferentes dominios de señalización en la proteína relacionados con otras posibles localizaciones en el parásito. De este modo, se han localizado los siguientes motivos homólogos a motivos del mismo tipo encontrados en la base de datos de secuencias analizadas de levaduras y animales y que se representan en la figura V.9:

- Motivo de exportación hacia la mitocondria: **CRGAA**
- Motivo de exportación al núcleo: **KPRK, PAAKPRK**
- Motivo de retención en la membrana del retículo endoplasmático: **RKKA**

Según la base de datos utilizada, el análisis de la secuencia es diferente, de tal manera que se predice una localización preferentemente nuclear de la proteína (65.2% de fiabilidad) en el caso de utilizar la base de datos referente a animales y levaduras, o citoplasmática, cuando se hace uso de referencias de secuencias bacterianas. Ya que *T. cruzi* es un organismo en el que se encuentran características de tipo procariota (transcripción policistronica) y eucarióticas, y





puesto que poco se conoce acerca de si existen o no secuencias tipo en el grupo al que pertenece que permitan la localización de las proteínas producidas, análisis posteriores serán hechos con el fin de esclarecer la posible utilización de un tipo de motivos u otros según lo conocido hasta ahora, y la posible ubicación final de la proteína LYT1.



	motivo de señalización mitocondrial	XXX	amidación		
	motivo de retención en r.e.	XXX	fosforilación pKC	XXX	zona rica en glutamina
	motivo de señalización nuclear	XXX	N-miristilación	XXX	fosfol. CKII + miristil.
	Sitio de corte para exportación a mitocondria	XXX	fosforil. pKC + miristilación	XXX	N-glicosilación
	Sitio de corte para secreción	XXX	fosforil. pKC + Casein kinasa II	XXX	fosforil. dep. GMPe y AMPe
		XXX	fosforilación casein kinasa II	XXX	fosforil. pKC + GMPe/AMPe

Figura V.9.-Representación gráfica de los sitios potenciales de la proteína LYT1 susceptibles de modificación. El tipo de modificaciones y su localización en la secuencia se muestran en la leyenda que acompaña a la figura..



### V.1.3 Transcripción y procesamiento del gen *LYT1*

Como se dijo anteriormente, cuando se observa el comportamiento de parásitos mutantes nulos para este gen y se compara con los parásitos salvajes, el resultado son diferentes fenotipos que se resumen en que los parásitos mutantes producen infecciones deficientes, sufren cambio de estadio acelerado *in vitro*, y tienen una disminuida actividad hemolítica a pH ácido. Cómo una proteína puede intervenir en procesos biológicos tan diversos es algo que no está claro. Sin embargo, y de acuerdo con el resultado anterior, una posibilidad sería el que se produjeran formas alternativas de la proteína en las que predominara un tipo de señal (de secreción, originando una forma de la proteína que estaría de acuerdo con los datos obtenidos referentes a la capacidad lítica de la proteína) u otro (de localización nuclear, que estaría de acuerdo con una posible función en el desarrollo de los estadios del parásito durante su ciclo de vida).

#### V.1.3.1 *Splicing* alternativo del gen *LYT1*

Basándonos en nuestro conocimiento acerca del proceso de “*trans-splicing*” en *T. cruzi* [Hummel, 2000], y en la secuencia nucleotídica de la región intergénica 5’ de *LYT1* (figura V.10), se dedujo la posibilidad de que existiera un proceso de “*splicing*” alternativo cuando se observó en esa región la existencia de dos colas de polipirimidinas (pPy) que podrían dirigir el “*splicing*” tanto hacia la posición -46 como +10 (en relación al primer ATG que ocuparía la posición +1)

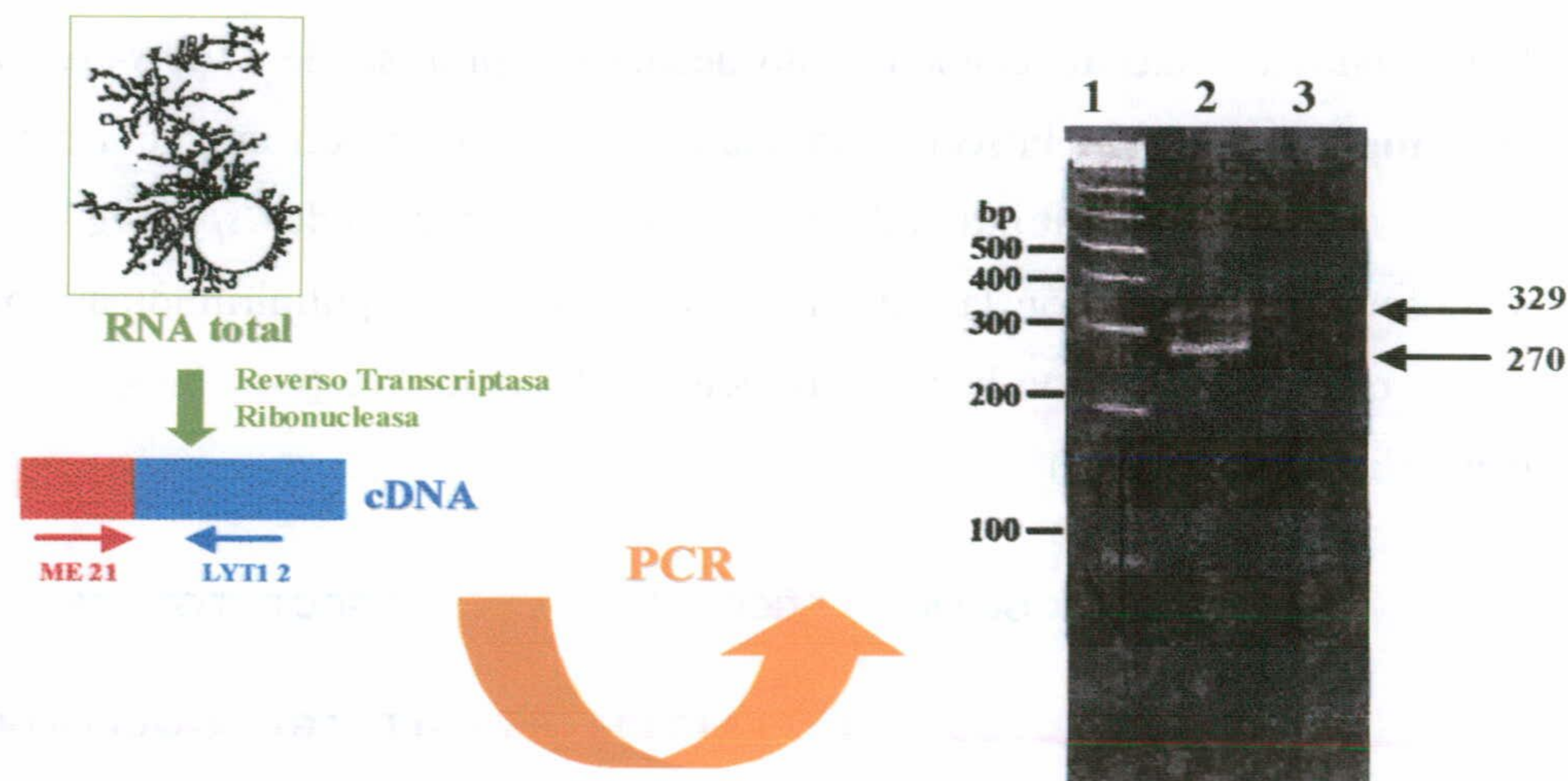
```

-86 GCTTCGCAAC TTGCCTTTTG CTCTCTGCCT TGTTGAAGTT
-46 TCCGCTCCTT TTTTTTTTTT TTTGTTTGT GGCCGTGCTC
-6 GCTCTCATGC GGAAGAAAGC CGCAGCATT A GCAGCGCCCA
35 CAGCAGACAC ACGGCCGACG TGCCGCGGGG CTGCCATTGC
75 CAATAAATTT ATGGAACGTG CCGGCCCCCG
  
```

Figura V.10.-Secuencia 5’ flanqueante y una parte de la secuencia codificante del alelo a del gen *LYT1* (cepa CI Brener). Los posibles sitios aceptores de “*splicing*” se muestran en verde recuadradas. En morado se muestran los codones de iniciación a la traducción en las posiciones +1 y +85. La posibles colas pPy se muestran en rosa



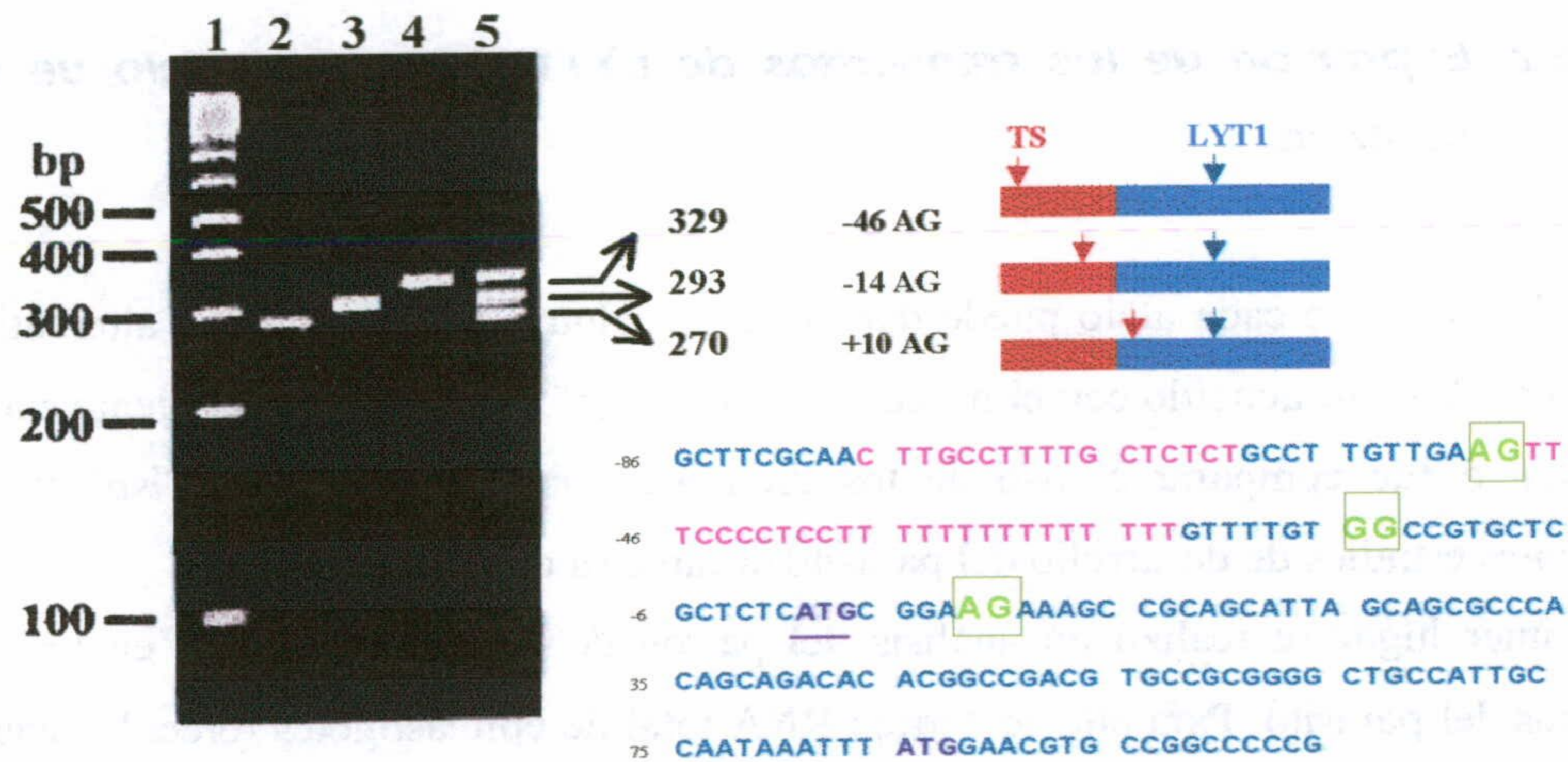
Para estudiar el producto de transcripción del gen *LYT1* y determinar si ambos RNAm se producían, se llevó a cabo la amplificación por PCR del RNAm del gen *LYT1*. Para ello, RNA total aislado de epimastigotes de la cepa CI Brener en fase de crecimiento semilogarítmico, tanto de la cepa salvaje como del clon de mutantes nulos L16, se sometió a la reacción de la reverso transcriptasa usando un oligo complementario a la región, que ocupaba desde la posición +648 a +672 de la secuencia codificante (*LYT1* 3', figura V.1). Después de realizar la digestión del RNA molde con ribonucleasa, la cadena del cDNA de *LYT1* fue entonces amplificada usando oligos homólogos a la región desde la posición 7 a 28 de la secuencia del miniexón (ME 21) y complementarios a la región desde la posición + 239 a +258 de la secuencia codificante de la proteína *LYT1* (*LYT1* 2). El producto de la PCR se separó electroforéticamente en un gel del 4% de agarosa, detectándose dos productos de amplificación, que se muestran en la figura V.11, lo que sugiere la existencia de múltiples RNAm maduros del gen *LYT1*. Como era de esperar, no se obtuvo ningún producto de amplificación en el clon L16, que no posee el gen *LYT1*.



**Figura V.11.-Reacción de Reverso transcriptasa de RNA total del gen *LYT1*.** Gel de agarosa al 4% marcado con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de 100 pares de bases standard (Roche); carriles 2 y 3, representan la amplificación de RNAm aislado de parásitos salvajes (2) y el clon L16 de mutantes nulos (3)



A continuación, y con el objetivo de determinar si habían sido utilizados diferentes sitios de adición del miniexón, los productos de amplificación se clonaron, obteniéndose tres productos diferentes (figura.V.12). El análisis de sus secuencias confirmó que el proceso de “*trans-splicing*” tenía lugar en las posiciones -46 y -14 de la región que flanquea el extremo 5' aguas arriba del sitio ATG<sub>(+1)</sub> de *LYT1* de inicio de la traducción, y en la posición +10 dentro de la pauta abierta de lectura del gen (figura V.10).



**Figura V.12.- Análisis de los clones de cDNA de *LYT1*** PCR de los productos generados en la figura anterior usando ME 21 y *LYT1* 2 como oligos y los cDNAs clonados de *LYT1* como moldes. Carril 1, marcador de 100 pares de bases standard (Roche); carril 2, producto de amplificación del cDNA con “*splicing*” en posición +10; carril 3, producto de amplificación del cDNA con “*splicing*” en posición -14; carril 4, producto de amplificación del cDNA con *splicing* en posición -46. El conjunto de productos de amplificación se muestra en el carril 5. A la derecha de la imagen se muestran las longitudes respectivas de los productos de amplificación.

El transcrito spliceado en posición -14 (293 pb) no se detectó en el gel teñido con bromuro de etidio, lo que sugería que este transcrito se producía en menor cantidad que los otros dos productos (329 pb y 270 pb). Cuando se analizó la secuencia nucleotídica de los alelos a y b del gen *LYT1*, se observó en las regiones 5' flanqueantes respectivas el dinucleótido GG en la posición -14. Por lo tanto, el “*splicing*” en esa posición no es el esperado ya que no existe la secuencia consenso AG aceptora de “*splicing*” .y, aunque parece que ocurre, lo hace de una



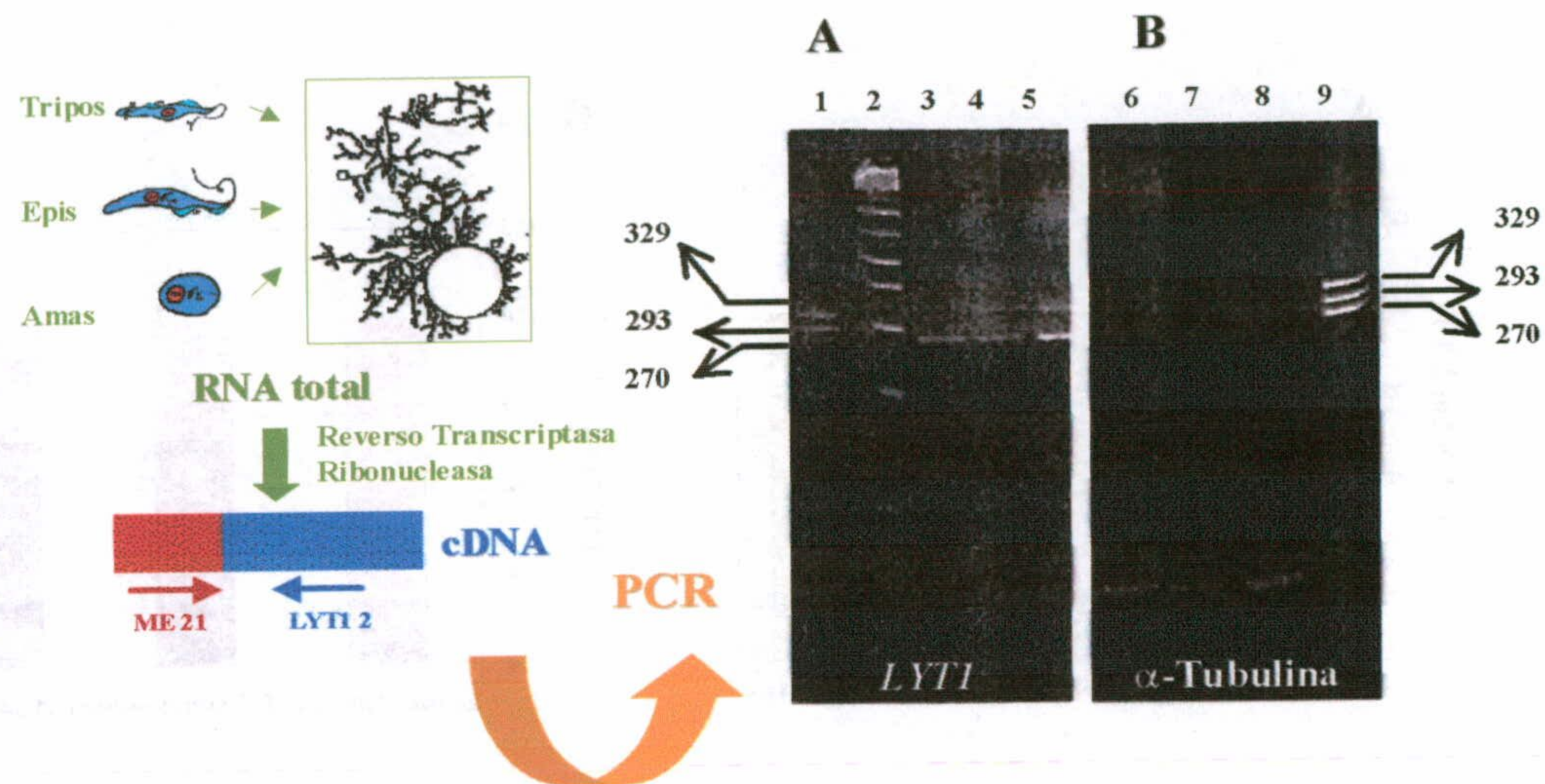
forma minoritaria. La utilización del sitio GG como aceptor del miniexón parece venir determinado por la existencia de una cola de pPy secuencia arriba del mismo.

En base a la secuencia, todas las posibilidades descritas de “*splicing*” pueden ocurrir a partir de cualquiera de los dos alelos del gen, lo que da lugar a dos transcritos diferentes: uno de ellos codificaría la forma completa de la proteína que incluye una probable secuencia señal amino terminal, y el otro codificaría una forma amino terminal truncada que pierde la secuencia señal.

#### V.1.3.2 **Expresión de los transcritos de *LYT1* durante el ciclo de vida del parásito.**

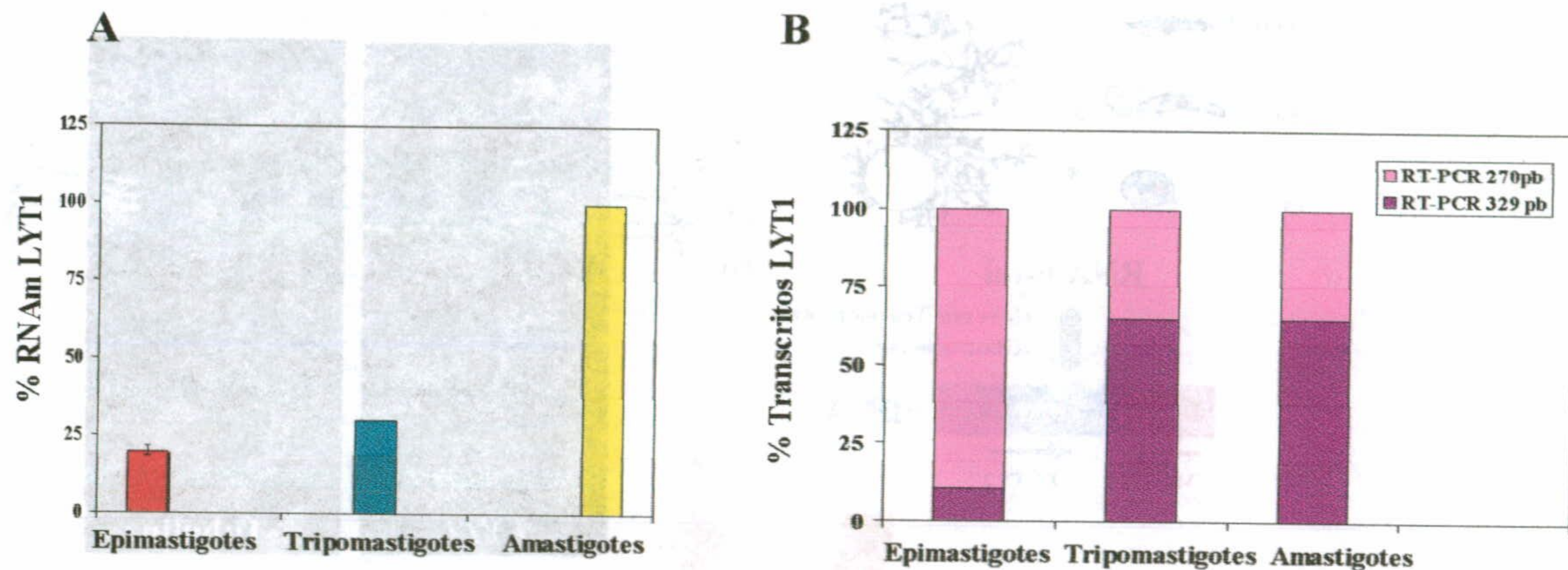
Considerando que cada alelo puede dar lugar a cualquiera de las formas alternativas de la proteína *LYT1* de acuerdo con el proceso de “*splicing*” alternativo, la siguiente cuestión que se planteó fue comparar el uso de los diferentes sitios aceptores de “*splicing*” en los diferentes estadios de desarrollo del parásito durante su ciclo de vida.

En primer lugar se realizó un análisis del patrón de expresión del gen en los diferentes estadios del parásito. Para ello se extrajo RNA total de epimastigotes (crecidos hasta la fase semilogarítmica), tripomastigotes (purificados usando un anticuerpo específico de tripos) y amastigotes (purificados usando el anticuerpo 2C2B6  $\alpha$ Sp4). Amastigotes y tripomastigotes se aislaron después de la conversión *in vitro* de epimastigotes. A través de la inmunoprecipitación se obtuvieron cultivos que eran 95-99% puros para cada uno de los estadios. El RNA total se utilizó como molde para una reacción de RT-PCR usando el oligo *LYT1* 3' para la RT, y los oligos ME 21 y *LYT1* 2 para la amplificación, como se describió en el apartado anterior, y cuyo resultado se muestra en la figura V.13A. Como control interno, se analizó de forma similar la expresión de transcritos para el gen de la  $\alpha$ -tubulina, que se llevó a cabo con un oligo marcado en el extremo 5', complementario a los nucleótidos 25 al 45 de la secuencia codificante de la proteína, observando una expresión similar para todas las formas de desarrollo. Los productos resultantes se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 4% (figura V.13B)



**Figura V.13.- Geles de agarosa al 4% donde se analizan los productos de RT-PCR de los genes *LYT1* y  $\alpha$ -Tubulina.** Carril 1, conjunto de los productos de PCR de 270, 293 y 329 pb; carril 2, marcador de 100 pares de bases (Roche). De los carriles 3 al 5 se muestran los productos de RT-PCR del gen *LYT1* generados a partir de la misma cantidad inicial de RNA total aislado de epimastigotes (carril 3), tripomastigotes (carril 4), y amastigotes (carril 5). Carriles 6 al 8 muestran los productos de RT-PCR de la  $\alpha$ -Tubulina generados a partir de la misma cantidad de RNA total de epimastigotes (carril 6), tripomastigotes (carril 7), y amastigotes (carril 8). El carril 9 es igual al 1.

A continuación se realizó un análisis de los transcritos obtenidos, que se cuantificaron por densitometría (Sigma Gel software, versión 1.0), con el fin de conocer, por un lado, la abundancia relativa del RNAm del gen *LYT1* en cada estadio, como aparece en la figura V 14A (que se determinó comparando entre sí y con la abundancia de los productos de extensión de  $\alpha$ -tubulina, que se generan en la misma reacción), y por otro lado, para determinar la cantidad relativa de cada RNAm del gen *LYT1* en las diferentes formas de desarrollo, comparando la abundancia relativa de los productos de RT-PCR de 329-pb y 270-pb (productos mayoritarios en la reacción y visibles en el gel). El resultado se muestra en la figura V 14B



**Figura V.14.-Expresión de las diferentes formas de RNAm del gen *LYT1* durante el ciclo de vida del parásito.** La figura A muestra la cuantificación de los productos totales de RT-PCR (270 pb más 329 pb) del gel de la figura anterior. Cada muestra está normalizada de forma relativa a los productos de la  $\alpha$ -Tubulina aislados de las mismas formas de desarrollo. La figura B representa una cuantificación de la abundancia relativa de los productos de RNA del gen *LYT1* de 270pb y 329pb durante el ciclo de vida del parásito.

Se observó que los dos principales transcritos del gen *LYT1* (RNAm que sufren el proceso de “*trans-splicing*” en las posiciones -46 y +10) se producían en todos los estadios, pero que la cantidad de RNAm del gen *LYT1* era mayor en la forma amastigota que en las otras dos, y que el transcrito que codifica la forma de la proteína *LYT1* completa (producto de RT-PCR de 329 pb) representa el 65% del total del RNAm del gen *LYT1* en tripomastigotes y amastigotes, pero solo el 10.5% en epimastigotes.



## **V.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CONSTRUCCIONES ESPECÍFICAS DEL GEN *LYT1*.**

### **OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES**

Utilizando el sistema de expresión basado en el vector pGEX-2T, y tras amplificar por PCR un fragmento de 1743 pb que incluía la pauta abierta de lectura del gen *LYT1*, éste fue clonado de forma direccional en los sitios *BamHI* y *EcoRI*. La expresión de la proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, daba lugar, en geles del 10% de acrilamida, a una banda de 88 KDa, que, al ser purificada por columna de afinidad de glutatión sepharosa 4B, derivaba a un péptido de 27 KDa. La optimización del método de purificación haciendo uso de diferentes estrategias permitió obtener un producto de 55 KDa, que contenía en su extremo amino terminal el dominio GST y en su extremo carboxi terminal unos 250 aminoácidos (28 KDa) del dominio amino terminal de la proteína *LYT1*. Utilizando este fragmento se realizaron las inmunizaciones adecuadas y se obtuvieron anticuerpos policlonales dirigidos contra esta región de la proteína [Cortés, A., tesis doctoral 1998].

#### **V.2.1 Construcción de los sistemas de expresión pGEX-2T-*LYT1* $\delta$ ss y pGEX-2T-*LYT1*Ct**

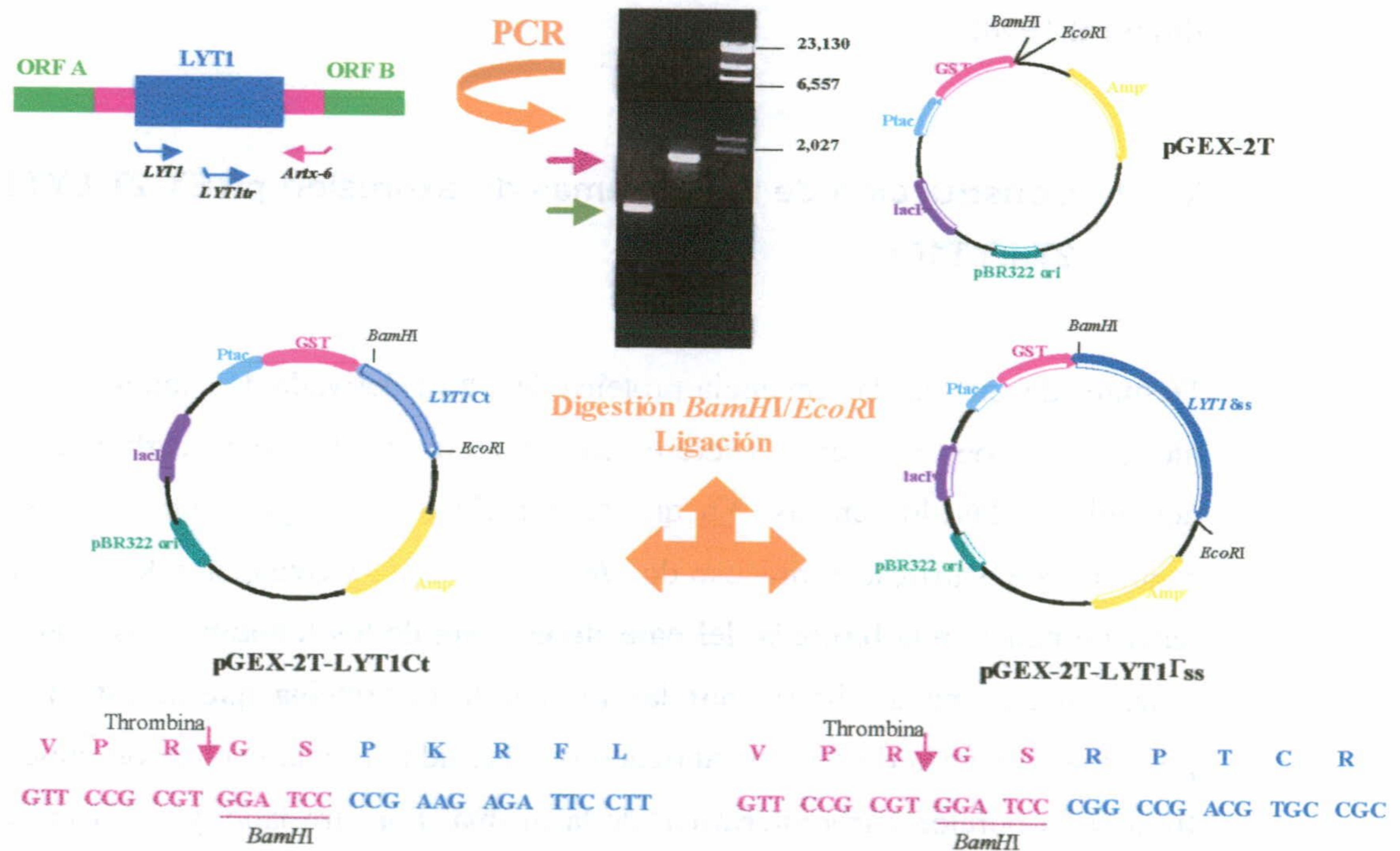
Después de analizar la secuencia proteica de *LYT1* derivada de cualquiera de las dos formas alélicas, se observó que, preferentemente, era en la zona carboxiterminal donde se acumulaban las diferencias. Ya que cada alelo podía originar dos formas de la proteína, según donde ocurriese el proceso de "trans-splicing", y considerando que cada forma podría tener un papel en la biología del parásito en vista de los fenotipos observados, se pensó que quizás una forma de diferenciar las formas de la proteína que se estuviesen produciendo podría ser, además de con los anticuerpos obtenidos previamente, con anticuerpos dirigidos frente a la porción carboxiterminal de la misma. Por otro lado, y en vista de los problemas derivados del intento de purificación de la proteína sin degradarse, se pensó en expresarla en ausencia de la secuencia señal, considerando el realizar experimentos de actividad hemolítica con la proteína completa si ésta podía ser recuperada. Además cuando se usaron los anticuerpos frente a los primeros 250 aminoácidos de la proteína con lisados totales de





mutantes nulos no se observaron diferencias respecto al reconocimiento antigénico frente a lisados totales de parásitos salvajes.

Se decidió realizar las construcciones apropiadas para la expresión de la proteína *LYT1* en ausencia de la secuencia señal, y la expresión de una forma truncada de la proteína que ocupara la fracción carboxiterminal de la misma. El plásmido de elección para la expresión de las formas de *LYT1* anteriormente descritas fue pGEX-2T. Las construcciones se realizaron mediante el clonaje direccional de los fragmentos específicos, obtenidos por PCR, del gen *LYT1*. Para ello, se diseñaron los cebadores *LYT1* (localizado a partir del nucleótido 45 de la pauta abierta de lectura del gen y que incorpora un sitio de restricción *Bam*HI), *LYT1tr* (localizado a partir del nucleótido 864 y que incorpora un sitio *Bam*HI), y *Artx-6* (localizado 65 nucleótidos corriente abajo del terminador de traducción y que incorpora un sitio de restricción *Eco*RI).



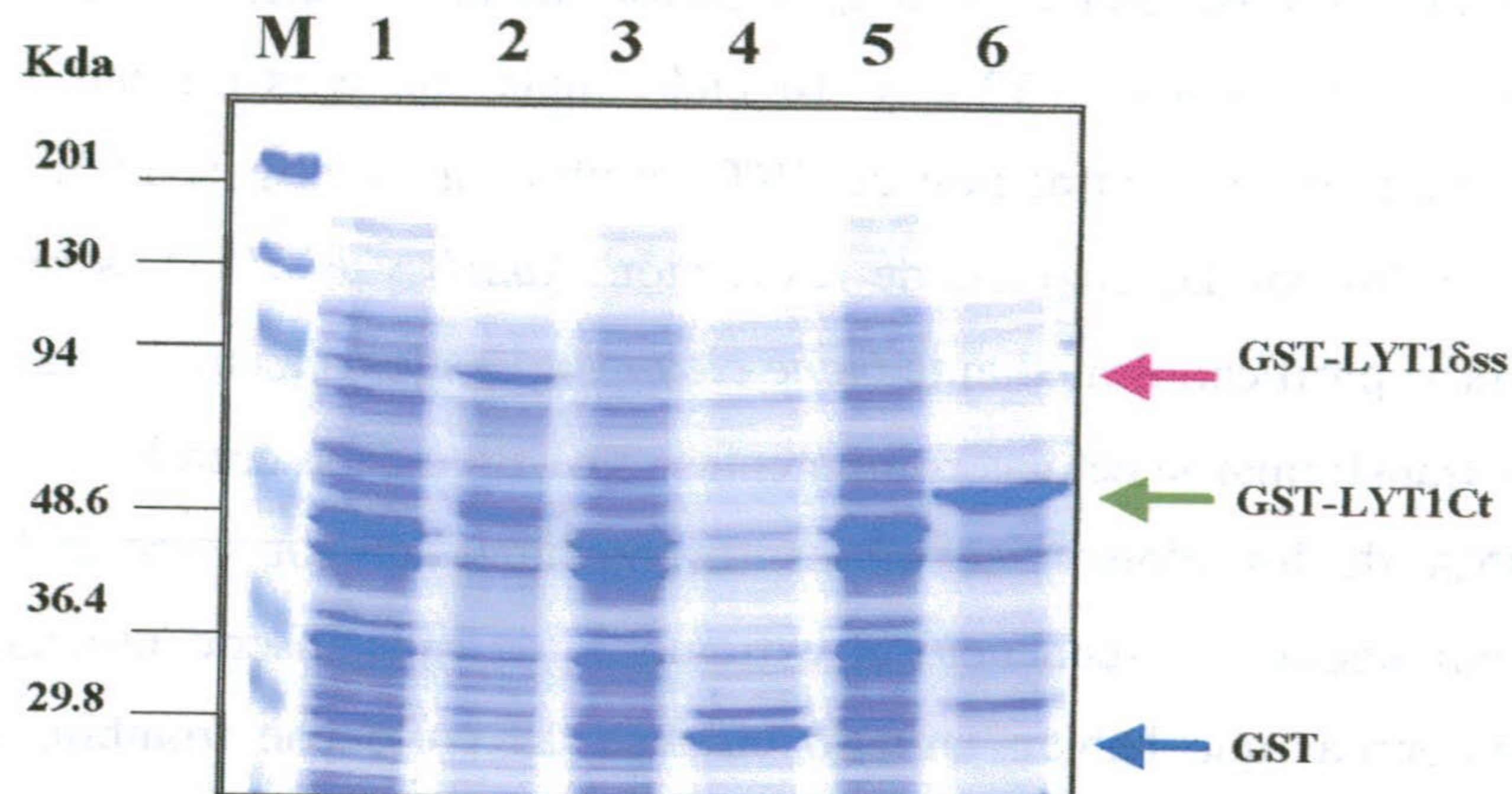
**Figura V.15.-Construcción y mapa de restricción de los clones pGEX-2T-LYT1Ct y pGEX-2T-LYT1 $\Delta$ ss** Los diferentes elementos integrados en el vector de expresión pGEX-2T se definen en la figura. También se indican las modificaciones de la proteína recombinante respecto a la nativa.



Utilizando como DNA molde el clon pGEM5Zf(+).5.8 y el par LYT1/Artx6 se amplificó una banda de 1696 pb, que daba lugar a una forma de la proteína en la que faltaban los primeros 15 aminoácidos. Con el par LYT1tr/Artx6 se amplificó una banda de 867 pb, que daba lugar a una proteína truncada formada por los 265 aminoácidos de la región carboxi terminal. Las condiciones usadas para la amplificación fueron: 10 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 31°C y 2 minutos a 72°C y 10 ciclos más con esas mismas condiciones pero con una temperatura de hibridación de 46°C. Ambos productos de PCR así como el vector fueron digeridos con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*. Los productos de las digestiones fueron purificados mediante *Gene clean*® y ligados a temperatura ambiente durante 4 horas. Se transformaron células competentes XLI-Blue de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* y se aisló DNA de los clones recombinantes mediante el Kit *Wizard Miniprep* de *Promega*. A continuación, se secuenció el extremo 5' de cada inserto utilizando el oligo pGEX5' para comprobar que habían entrado en fase. El corte con trombina de la proteína de fusión generada en este sistema de expresión permitiría obtener, en el caso de la forma sin secuencia señal, la proteína modificada respecto a la nativa por adición del par glicina-serina (que son necesarios para crear el sitio de corte), mientras que estos aminoácidos no modificarían la forma truncada por estar presente en la forma truncada nativa, como se muestra en la figura V.15.

## V.2.2 Purificación de los péptidos LYT1 $\delta$ ss y LYT1Ct.

La expresión de ambas construcciones de fusión con GST producidas por células de *E. coli* según el sistema basado en el plásmido pGEX-2T, se encuentra bajo el control del promotor *tac*, que es inducido por la adición al medio de cultivo de IPTG, un análogo no metabolizable de la lactosa. La expresión de la proteína de fusión generada a partir de la construcción pGEX-2T-LYT1 $\delta$ ss originaba una banda de 85.5 KDa y de 55.4 KDa para la construcción pGEX-2T-LYT1Ct, correspondientes, en cada caso, a 27 KDa de GST más 58.5 KDa de LYT1 $\delta$ ss o más 28.4 KDa de LYT1Ct. La expresión de ambas proteínas se muestra en la figura V.16.

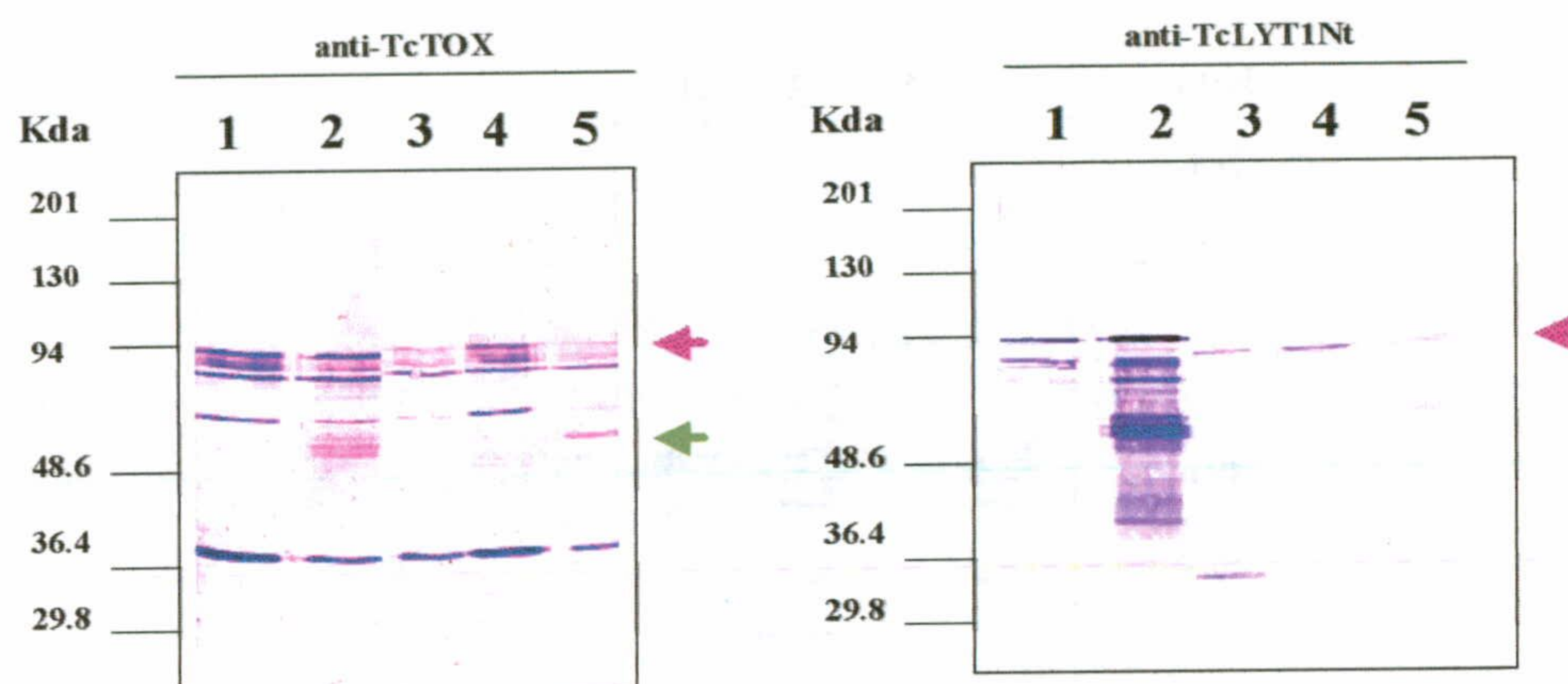


**Figura V.16.-Expresión de las proteínas de fusión GST-LYT1 $\delta$ ss y GST-LYT1Ct en *E. coli*.**

1ml de cultivo de bacterias XLI-Blue transformadas con las construcciones de LYT1 fueron inducidas con 0.1 mM de IPTG, centrifugadas, resuspendidas en tampón de carga 2x y desnaturalizadas. En un gel del 10% de acrilamida se cargaron 15  $\mu$ l de cada muestra en el siguiente orden: M, marcador preteñido de amplio espectro; carril 1, pGEX-2T-LYT1 $\delta$ ss no inducido; carril 2, pGEX-2T-LYT1 $\delta$ ss inducido; carril 3, pGEX-2T no inducido; carril 4, pGEX-2T inducido; carril 5, pGEX-2T-LYT1Ct no inducido; carril 6, pGEX-2T-LYT1Ct inducido

Ambas proteínas de fusión fueron reconocidas por anti-TcTOX cuando lisados de bacterias BL21 transformadas con las construcciones anteriores e inducidas por adición de IPTG fueron analizados por *Western Blot*.

Sin embargo sólo la proteína de fusión pGEX-2T-LYT1 $\delta$ ss fue reconocida cuando se utilizó el anticuerpo anti-LYT1Nt, demostrando la especificidad del mismo frente a la región amino terminal de la proteína y la rigurosidad de la construcción de la región carboxilo terminal (figura V.17). Como controles se utilizaron los lisados bacterianos transformados con las construcciones sin inducir y un lisado de bacterias transformadas sólo con pGEX-2T e inducidas en las mismas condiciones.

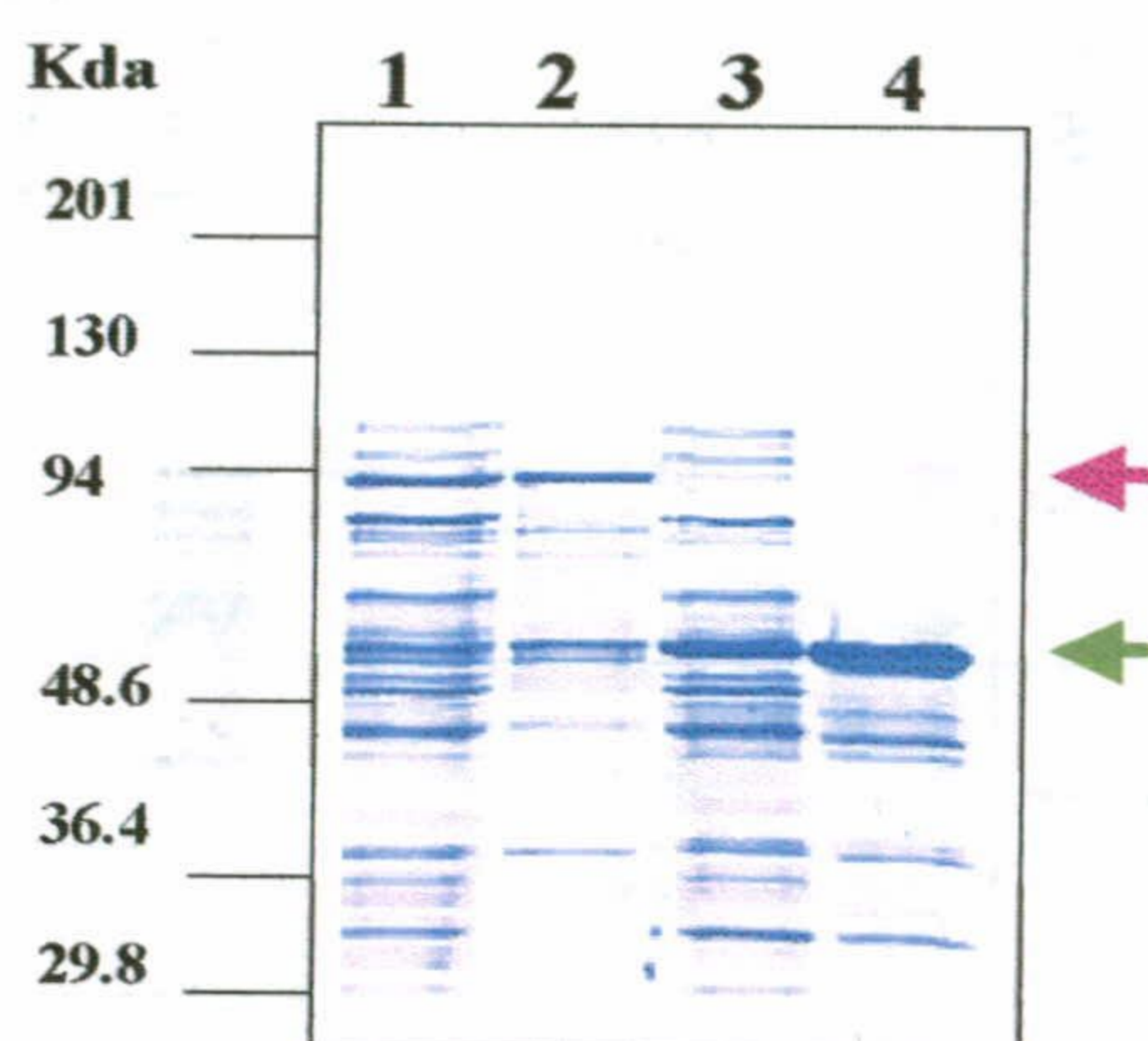


**Figura V.17.-Reconocimiento inmunológico de las proteínas de fusión GST-LYT1 $\delta$ ss y GST-LYT1Ct por anti-TcTOX y anti-TcLYT1Nt.** En un gel de acrilamida del 7.5% se cargaron 15  $\mu$ l por carril, procedentes de un cultivo de 1ml de bacterias transformadas con pGEX-2T-LYT1 $\delta$ ss no inducido (carril 1); pGEX-2T-LYT1 $\delta$ ss inducido (carril 2); pGEX-2T inducido (carril 3); pGEX-2T-LYT1Ct no inducido (carril 4); pGEX-2T-LYT1Ct inducido (carril 5). El gel se transfirió a una membrana (Inmobilon-P) y se inmunodetectó con anticuerpos generados en conejo frente a Tc-TOX (dilución 1:200) o a TcLYT1Nt (100 ng/ml), y con una dilución 1/3000 de anti IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario

A continuación, se realizó un ensayo de solubilidad en el que 1ml de cultivo de bacterias transformadas y crecidas durante toda la noche a 37°C, fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en 0.5 ml de PBS + 1% Tritón X-100, sonicadas durante 30 segundos y centrifugadas de nuevo a 12000rpm durante 1 minuto para separar las fracciones soluble e insoluble. 10  $\mu$ l de la fracción soluble se mezclaron con un volumen igual del tampón de carga 2x, y el pellet se resuspendió en 0.5 ml de agua de los que se tomaron 10  $\mu$ l, que se mezclaron con un 10  $\mu$ l del tampón de carga 2x. Tras la electroforesis se observó que, mientras que GST-LYT1 $\delta$ ss se localizaba al 50% en cada una de las fracciones separadas, GST-LYT1Ct se localizaba preferentemente en la fracción insoluble. En la figura V.18 se muestra como, tras realizar una optimización de los posibles parámetros implicados en la expresión y solubilidad de ambas construcciones, se determinó que 10  $\mu$ M de IPTG para



GST-LYT1 $\delta$ ss, y 50  $\mu$ M para GST-LYT1Ct, 6 horas de inducción y crecimiento a 30°C en los dos casos, eran las condiciones con las que se obtenía máxima expresión con menor degradación, así como se forzaba hacia una mayor solubilidad de GST-LYT1Ct.

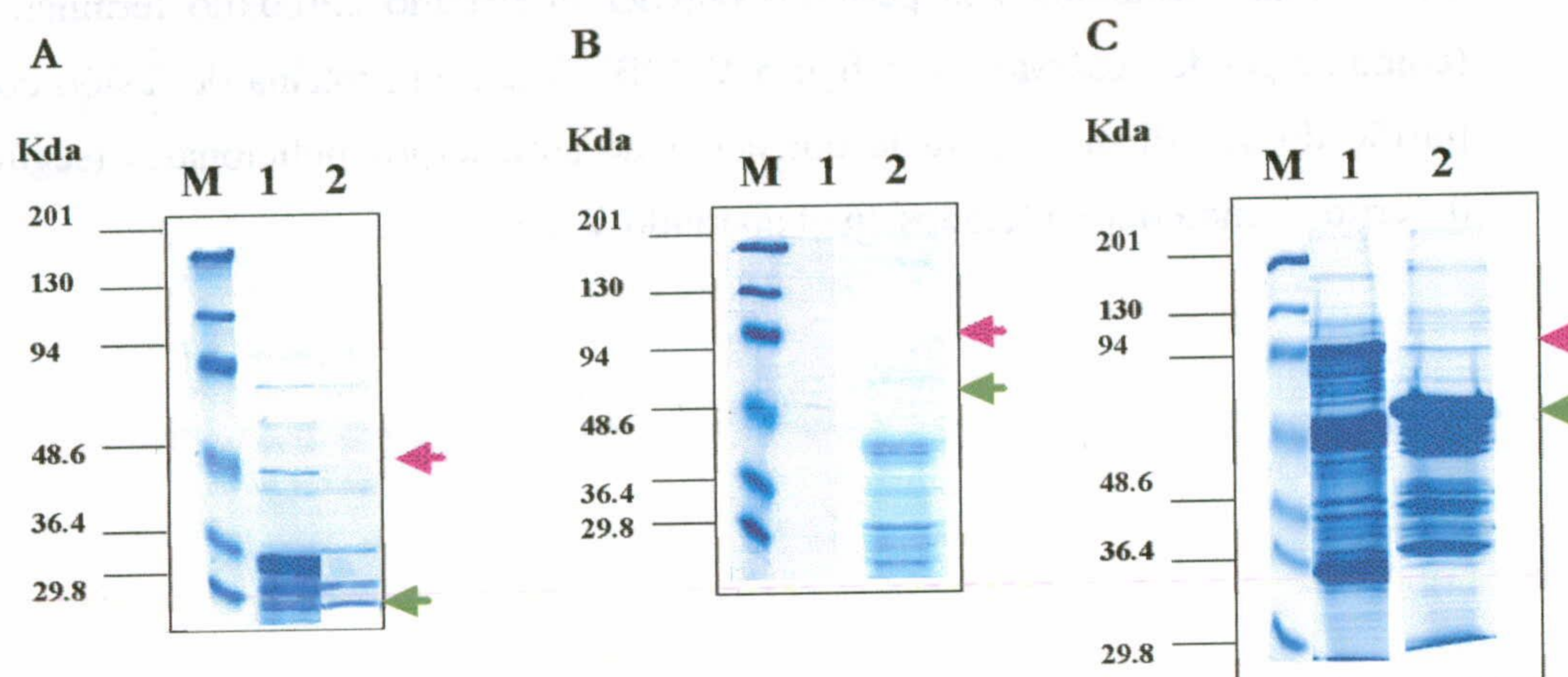


**Figura V.18.-Optimización de las condiciones de expresión de LYT1 $\delta$ ss y LYT1Ct.** Bacterias transformadas con pGEX-2T-LYT1 $\delta$ ss y pGEX-2T-LYT1Ct fueron inducidas durante 6 horas y a 30°C con 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M de IPTG, respectivamente. A continuación se separaron la fracción soluble e insoluble y se cargaron en un gel de acrilamida del 7.5% en el siguiente orden: carril 1, pGEX-2T-LYT1 $\delta$ ss fr.soluble; carril 2, pGEX-2T-LYT1 $\delta$ ss fr. insoluble; carril 3, pGEX-2T-LYT1Ct fr. soluble; carril 4, pGEX-2T-LYT1Ct fr. insoluble.

En base a estos datos, y a los obtenidos de la purificación anterior de la fracción amino terminal de LYT1, se inició la purificación de las proteínas GST-LYT1 $\delta$ ss y GST-LYT1Ct a gran escala por columna de afinidad de glutation sepharosa-4B siguiendo las condiciones recomendadas por la casa comercial y descritas en el apartado V.2.3.4, de material y métodos. La purificación de ambas proteínas unidas a la columna se intentó tanto a partir de la elución con glutatión reducido como a través del corte con thrombina. Sin embargo, el análisis en gel SDS-PAGE del 10% de las proteínas purificadas por ambos métodos dio lugar a concentraciones muy bajas de ambas, así como un patrón de bandas que indicaban un posible proceso de degradación. A pesar de utilizar la cepa BL21 (deficiente en el gen estructural *OmpT*) y una mezcla de inhibidores de proteasas durante la resuspensión celular, no se evitó que las muestras sufrieran parte de degradación, confirmando la gran inestabilidad de la proteína LYT1, que desde el primer momento, incluso antes de la lisis bacteriana, ya se encuentra degradada parcialmente, como se puede observar en la figura



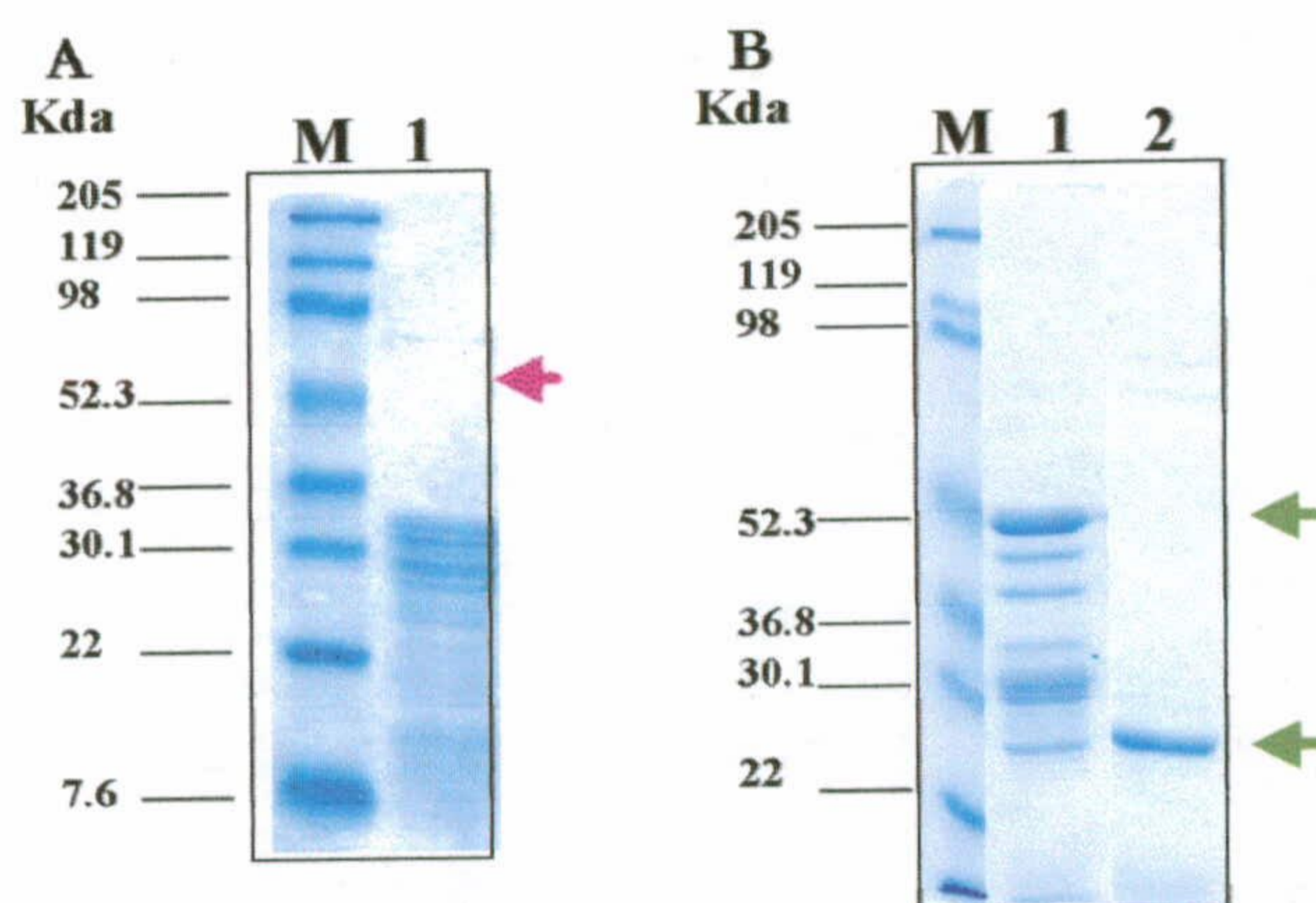
V.19A y B. Se determinó que una de las causas era que GST-LYT1 $\delta$ ss y GST-LYT1Ct se retenían pobremente en la resina, con lo que se incrementó el tiempo de incubación con la columna, mejorándose este proceso (figura. V 19C).



**Figura V.19.-Optimización de las condiciones de purificación de LYT1 $\delta$ ss y LYT1Ct.**

- A) En un gel del 10% se cargaron en las siguientes alícuotas tras el corte de la proteína de fusión con trombina: carril 1, alícuota de la elución de LYT1 $\delta$ ss; carril 2, alícuota de la elución de LYT1Ct.  
 B) En un gel del 10% se cargaron las siguientes alícuotas tras la elución de las muestras con 5 mM de glutatión reducido: carril 1, elución de GST-LYT1 $\delta$ ss; carril 2, elución de GST-LYT1Ct.  
 C) carril 1, GST-LYT1 $\delta$ ss unida a la resina; carril 2, GST-LYT1Ct unida a la resina.

A continuación se optimizaron los parámetros referentes al corte con trombina y la elución con glutatión. GST-LYT1 $\delta$ ss se intentó purificar mediante incubación durante 6 horas a temperatura ambiente con trombina y posterior elución, pero se obtuvo un rendimiento bastante pobre y una degradación importante de la muestra que no permitió realizar experimentos de actividad hemolítica (figura V 20A).



**Figura V.20.-Últimas etapas de purificación de LYT1 $\delta$ ss y LYT1Ct.**

- A) gel de acrilamida al 12.5%, carril 1, alícuota procedente de la elución de LYT1 $\delta$ ss tras corte con trombina.  
 B) gel de acrilamida al 10%, carril 1, alícuota procedente de la elución de LYT1Ct con 20 mM de glutatión reducido; carril 2, obtención de LYT1Ct tras corte con trombina de la muestra anterior.



GST-LYT1Ct se purificó mediante elución desde la resina con 20 mM de glutatión. Este producto purificado contiene en su extremo amino terminal el dominio GST y en su extremo carboxilo terminal el dominio carboxilo terminal de la proteína LYT1. La digestión de GST-LYT1Ct con trombina nos permitió obtener el péptido carboxilo terminal de 28.4 KDa (como se puede observar en la figura V 20B). Tanto la proteína de fusión como el péptido purificado se utilizaron para la obtención de anticuerpos policlonales (según el protocolo descrito en material y métodos en el apartado V.2.3.7)



### V.3 EXPRESIÓN DE LYT1 EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DEL PARÁSITO

Utilizando anti-LYT1Nt frente a lisados y sobrenadantes condicionados a pH 5.5 y 7.0 de epis-, tripo-, y amastigotes de *T. cruzi*, era reconocida una banda de 80.3 KDa que no desaparecía ni en lisados ni en sobrenadantes de epimastigotes o metacíclicos mutantes nulos, por lo que se concluyó que anti-LYT1Nt reconocía una o varias proteínas de 80.3 KDa que no eran LYT1. Por otra parte, ni con anti-LYT1Nt, ni con anti-C9 o con anti-TcTOX se pudo identificar inmunológicamente la proteína LYT1 en los diferentes estadios del parásito, ya que las bandas reconocidas por los tres anticuerpos estaban presentes tanto en los parásitos salvajes como en los mutantes nulos [Cortés, A., tesis doctoral 1998].

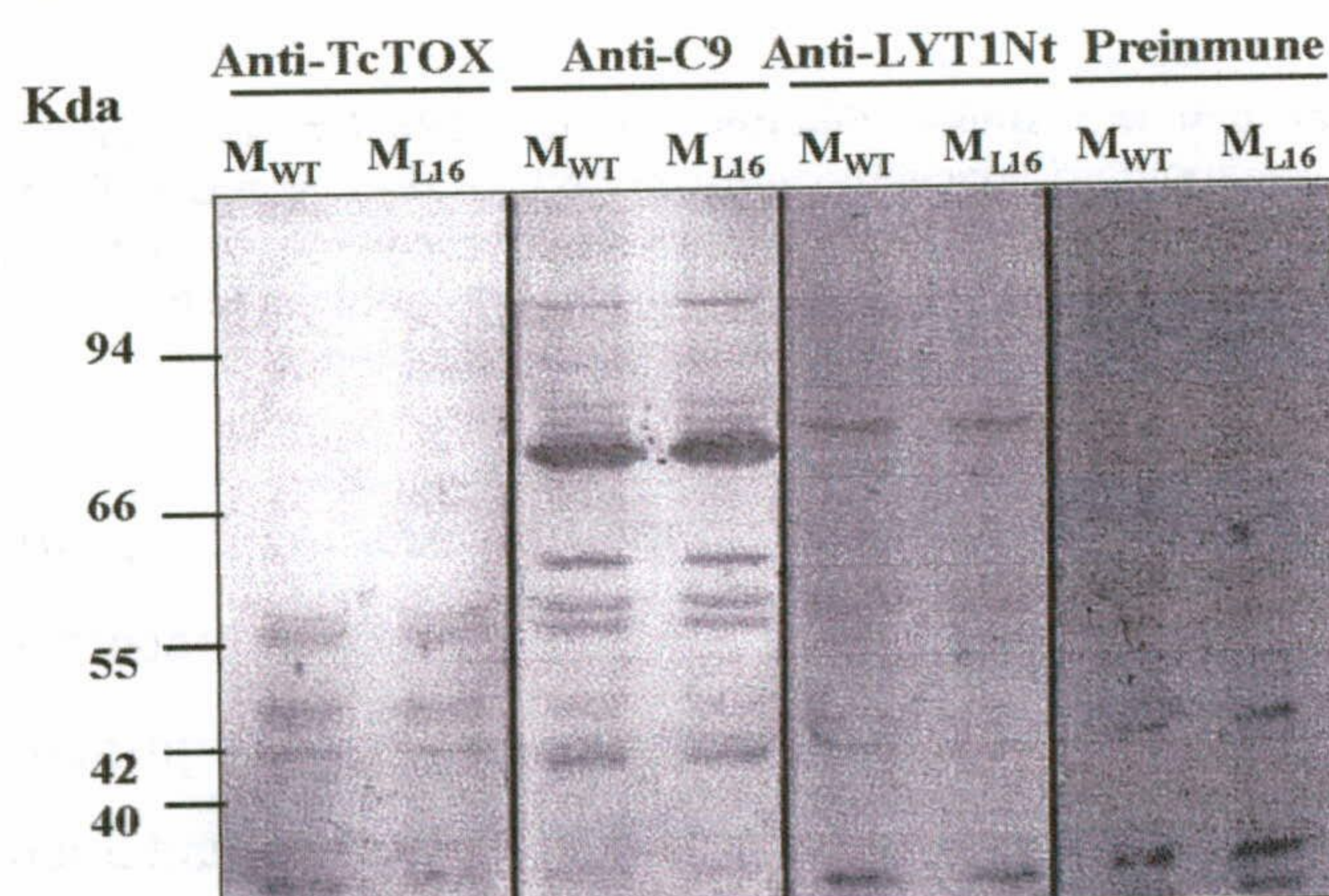


Figura V.21.-Inmunodetección en lisados de metacíclicos de *T. cruzi* de la línea salvaje (WT) y de los mutantes nulos (L16). Lisados de  $10^6$  metacíclicos fueron analizados por *Western blot* frente a anti-TcTOX, anti-C9, anti-LYT1Nt, y suero preinmune.

#### V.3.1 Inmunodetección de la proteína nativa.

Con objeto de conocer la expresión y localización (si es o no secretada) en los diferentes estadios, se desarrollaron anticuerpos frente a la región carboxilo terminal, donde se concentraban bastantes diferencias en la secuencia aminoacídica derivada de cada alelo del gen *LYT1*. En la figura V 22 se representa, de forma aproximada, la fracción de LYT1 frente a la que está dirigida los anticuerpos obtenidos en las inmunizaciones en esta tesis, respecto a



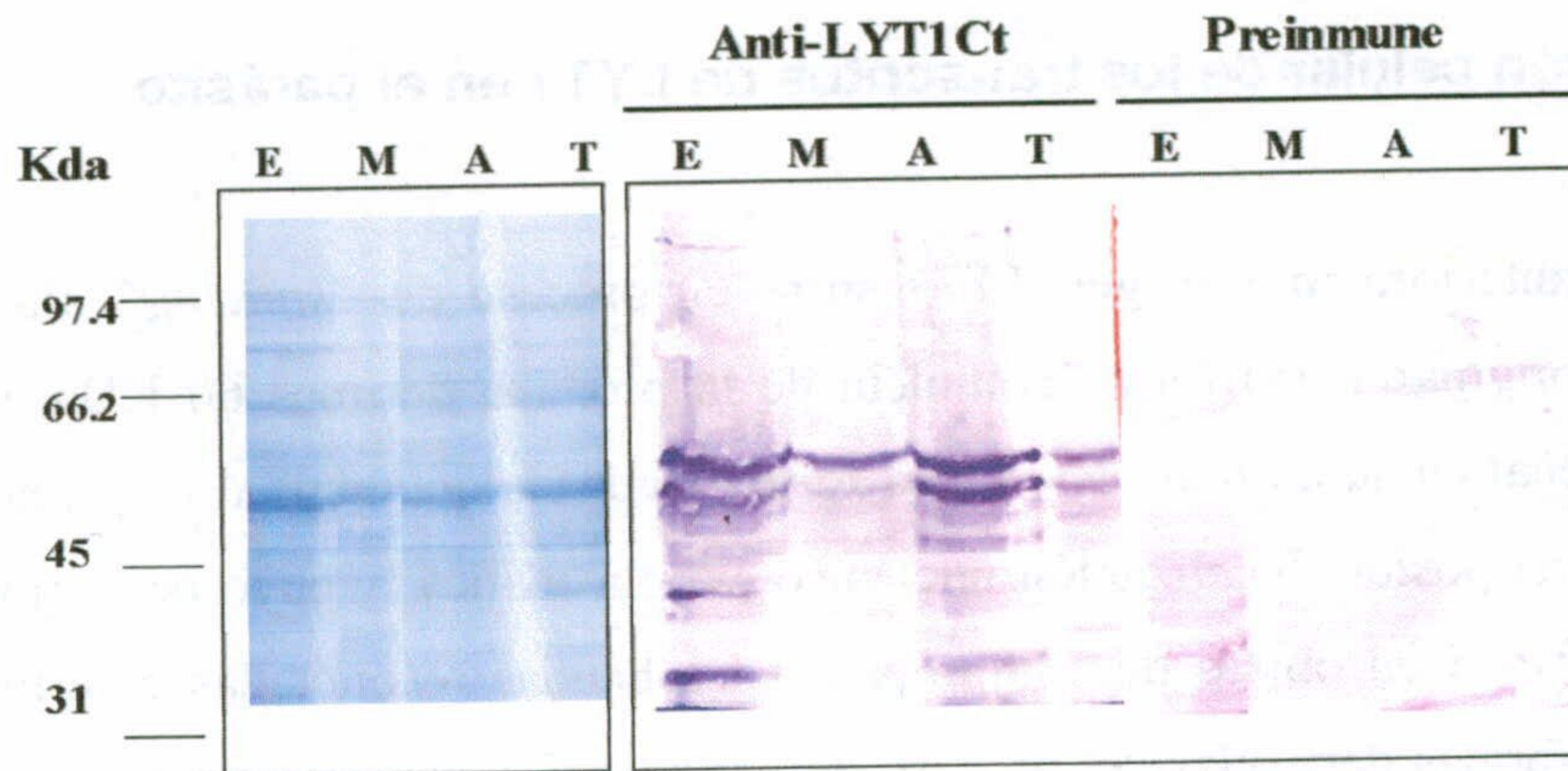


la región frente a la cual se dirigió anti-LYT1Nt, y las zonas de la proteína que presentan reconocimiento antigénico cruzado por anti-C9 y anti-TcTOX.

MRKKAALVA	PTADTRPTCR	GAALANNFMG	RAGPREGVGR	STEMPAAGPT	
GSQRSQTQRE	VKASQDADAA	AISSYFQSEL	VTSQSHEGVS	PLAKTRANER	
RNGEQEREKE	LPAVGGAVPT	GKGTDPKQRV	LQDLPAMHAE	GQNQHGREGD	✓ Anti-LYT1-Nt
KGVSVMQDSP	GRVQVLEQML	LHLAALNRQL	ELELIETPRE	LTMYKQLLPD	
VQRQTEAHAL	SQEHHKANSK	APPLMSDERR	RQMLFTGQQQ	QQQVEDLHG	✓ Anti-LYT1-Ct
GISGWETAAR	RMRYGYEEGE	RDALSDGEGR	PRCAGRMGSP	KRFLSTQPPR	
SSRNHRNPHA	ANGTNGNSHV	PHSSRQKSHP	TRGAAVTSVP	LAASATNRRG	✓ Anti-LYT1-Ct,
RSMRQHTRPR	GPSHLFERLD	AEDAIDMLET	LKLSIMYRCN	HSHHRSTEGD	anti Tc-TOX,
VVRPAAKPRK	GTRSVAPPPP	PPSMLSSSQR	KLAAVAGAP	ACSVSARHGR	anti-C9
NHGVSAVGDP	SRGNRVSETA	RIAHAPSFEG	KKCAPGLTQL	HFSSPSRRAT	
PMKKTPLSR	GQAAGVAAVA	VGGDQLEAL	QRRYWEQSRA	ILEQLENMLA	
AD					

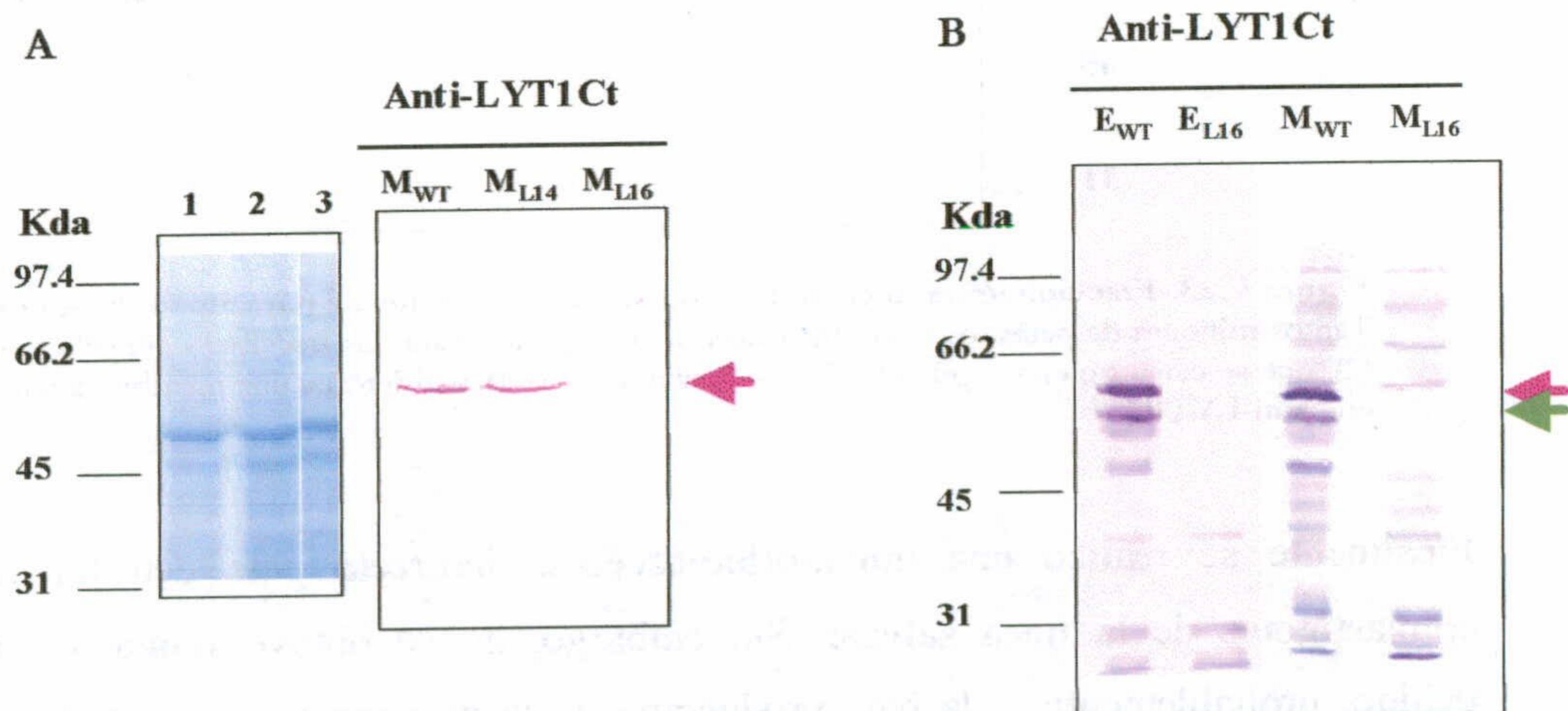
Figura V.22.-Secuencia aminoacídica derivada del alelo *LYT1b*. En rojo aparece la región de la proteína frente a la que va dirigido el anticuerpo anti-LYT1Nt; en verde la región frente a la que se dirige el anticuerpo anti-LYT1Ct, y en azul, se muestra una zona de solapamiento en el reconocimiento antigénico entre los anticuerpos anti-LYT1Ct, anti-TcTOX, y anti-C9. Los residuos diferentes entre los dos alelos aparecen subrayados

En primer lugar, lisados de parásitos en los tres estadios del ciclo celular de *T. cruzi* fueron analizados por *Western blot* usando como primer anticuerpo anti-LYT1Ct (1/500) o preinmune (1/500). Anti-LYT1Ct reconoció dos bandas principales en cada uno de los carriles: una de 60.2 KDa y la otra de 56.7 KDa, aproximadamente. La intensidad de éstas fue diferente según el estadio considerado: en amas-, epi- y tripomastigotes se observaban claramente las dos bandas (decreciendo su intensidad en ese orden de mayor a menor), mientras que en los parásitos metacíclicos sólo se observaba claramente la banda de mayor tamaño, siendo apenas visible la de menor tamaño. La especificidad del reconocimiento se demostró por la ausencia de bandas con el suero preinmune (figura V 23).



**Figura V.23.-Western blot de lisados de epi-, tripo-, amastigotes y metacíclicos con anti-LYT1Ct.** Lisados de  $4 \times 10^6$  parásitos en fase tripo- (T), epi- (E), amastigota (A), y metacíclica (M), fueron separados por electroforesis en un gel del 7.5% de acrilamida y transferidos a una membrana de Immobilon-P. La inmunodetección se llevó a cabo con anti-LYT1Ct (1/500) o suero preimmune (1/500). El anticuerpo secundario fue anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (1/3000).

Para comprobar si alguna de esas bandas era LYT1, se analizaron por *Western blot* los lisados de parásitos metacíclicos, obtenidos a partir de epimastigotes de la cepa salvaje, de un clon de mutantes simples (L14), y del clon de mutantes nulos. Se observó el patrón de expresión de la figura V 24 en metacíclicos del tipo salvaje y mutantes simples, mientras que ambas bandas desaparecían en los mutantes nulos, por lo que se concluyó que esas bandas correspondían a la expresión de LYT1.

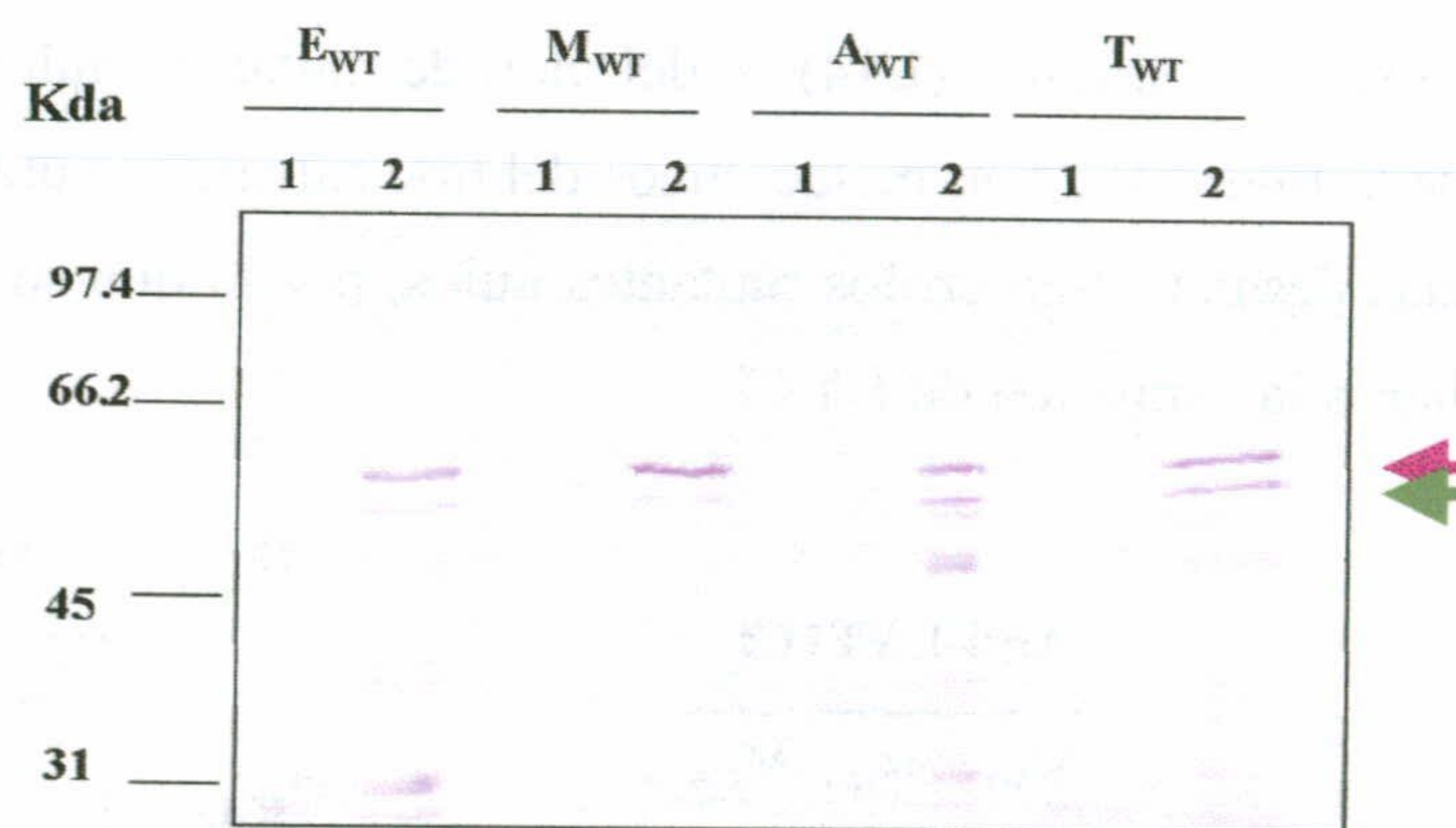


**Figura V.23.-Inmunodetección de lisados de epimastigotes y metacíclicos con anti-LYT1Ct.** A) Lisados de  $4 \times 10^6$  parásitos en fase metacíclica de parásitos salvajes (wt), mutantes simples (L14), y mutantes nulos (L16). B) Lisados de  $4 \times 10^6$  parásitos en fase metacíclica y epimastigotes de parásitos salvajes (wt), y mutantes nulos (L16).



### V.3.2 Localización celular de los transcritos de LYT1 en el parásito.

Como se comentó anteriormente, el gen *LYT1* sufre un proceso de “*splicing*” alternativo que, teóricamente, originaría una forma completa de la proteína de unos 60 KDa con una posible secuencia señal en su extremo Nt, y una forma truncada que perdía los primeros 28 aminoácidos, con una posible localización nuclear o citoplasmática, y cuyo peso molecular sería de unos 57 KDa. Con objeto de comprobar si las bandas reconocidas anteriormente correspondían a las formas derivadas del proceso de “*splicing*” y para determinar su posible localización, se realizó un fraccionamiento subcelular de los diferentes estadios de los parásitos salvajes de *T. cruzi* (figura V.23). Se separaron lisados celulares en una fracción soluble y una de membranas totales tal y como se describe en material y métodos, apartado V.2.1.6). Ninguna de las formas de la proteína aparecía en la fracción citosólica, aunque no se distinguió entre localización en la membrana plasmática o localización nuclear, debido a que ambas fracciones se recogieron juntas.



**Figura V.23.-Fraccionamiento celular de los distintos estadios de parásitos salvajes de *T. cruzi*.** Tantos millones de parásitos se centrifugaron a tanto para separar las fracciones citosólica (1) y de membranas (2), que se cargaron en un gel del 7.5% de acrilamida y se transfirieron a una membrana para inmunodetección con anti-LYT1Ct.

Finalmente se realizó una inmunofluorescencia indirecta para detectar la proteína en epimastigotes de la línea salvaje. Sin embargo, no se obtuvo ninguna señal detectable debido, probablemente, a la baja producción de la proteína en este estadio, por lo que se decidió sobreexpresar la proteína. Los resultados se recogen en el apartado V.5.3.1.



## **V.4 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL GEN *LYT1***

Utilizando técnicas genéticas, por las que se obtuvieron mutantes nulos para el gen, se estudió la función biológica de *LYT1*, realizando un análisis comparativo de los procesos de infección originados por los parásitos salvajes y los mutantes nulos. Se observó que, mientras que la capacidad invasiva de ambas líneas de parásitos era similar, la capacidad de las líneas mutantes para completar la infección *in vitro* se redujo en un 90-95%. Sin embargo, existía una pequeña proporción de células (entre un 15-20%) en las que la infección continuaba su curso normal. Se observó, asimismo, que la actividad hemolítica se reducía en epimastigotes y metacíclicos derivados de las líneas mutantes, respecto a los correspondientes estadios de la línea salvaje. Con estos datos, se postuló que *LYT1* estaba implicada en el proceso de infección por *T. cruzi*, posiblemente en una etapa posterior a la entrada del parásito de la célula huésped, y en relación a la salida del parásito de la vacuola al citosol.

### **V.4.1 Participación de *LYT1* en el proceso de infección.**

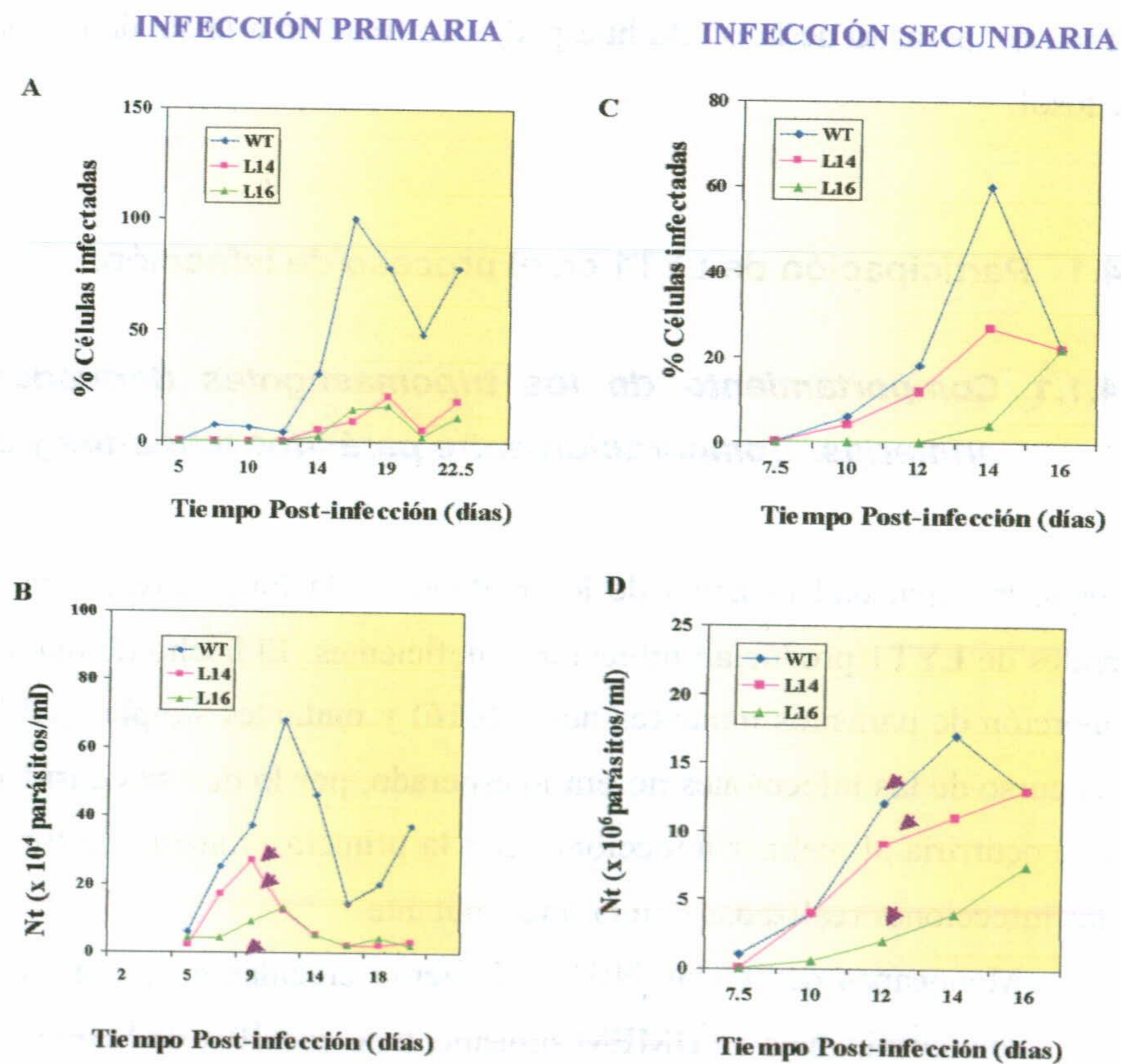
#### **V.4.1.1 Comportamiento de los tripomastigotes derivados de infecciones primarias. Comparación entre parásitos mutantes y salvajes.**

Aunque la capacidad invasiva de los mutantes y la línea salvaje era similar, los parásitos carentes de *LYT1* producían infecciones deficientes. El hecho de que existiera una pequeña proporción de parásitos mutantes nulos (L16) y mutantes simples (L14) en el sobrenadante en el curso de las infecciones no era lo esperado, por lo que se consideró de interés estudiar lo que ocurriría al realizar infecciones con la primera progenie de tripomastigotes liberados en las infecciones realizadas con la línea mutante.

- ✓ Monocapas de células NIH 3T3 fueron crecidas en placas de 24 pocillos hasta la semiconfluencia en DMEM suplementado con 10% de SBFi e infectadas con  $2 \times 10^6$  epimastigotes/ml en fase semilogarítmica (mdi: 10). Los parásitos se eliminaron a las 48 horas, y las células fueron lavadas cada dos días para eliminar los parásitos que no habían infectado, añadiendo medio fresco cada vez.



- ✓ Para los experimentos de infecciones secundarias, tripomastigotes resultantes de la infección anterior se separaron de los amastigotes y de restos celulares, y en igual número para todas las líneas ( $2 \times 10^4$  tripomastigotes/ml), se utilizaron para infectar nuevos pocillos con monocapas semiconfluentes de células 3T3. Los pocillos se lavaron a las 2 horas. Del mismo modo que antes, las células se lavaron cada dos días y se recogieron muestras de parásitos en el sobrenadante.
- ✓ Una célula huésped se consideró infectada cuando se observaron amastigotes en su interior. Las infecciones fueron observadas diariamente, determinándose el número de tripomastigotes y amastigotes en el sobrenadante. El porcentaje de células infectadas se determinó por observación microscópica comparando el número de células con parásitos respecto al número total de células (figura V.26)



**Figura V.26.- Disminución de la infectividad in vitro debido a las sustituciones alélicas del gen *LYT1*** Monocapas de células NIH 3T3 fueron infectadas con la línea salvaje, L14 y L16. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes. (A y C) muestran el porcentaje de células infectadas 48 horas después de la infección con epimastigotes y 2 horas después de la infección con tripomastigotes, respectivamente. (B) representa el número de parásitos en el sobrenadante en el transcurso de la infección con epimastigotes y (D) el número de parásitos en el sobrenadante en la infección con tripomastigotes.

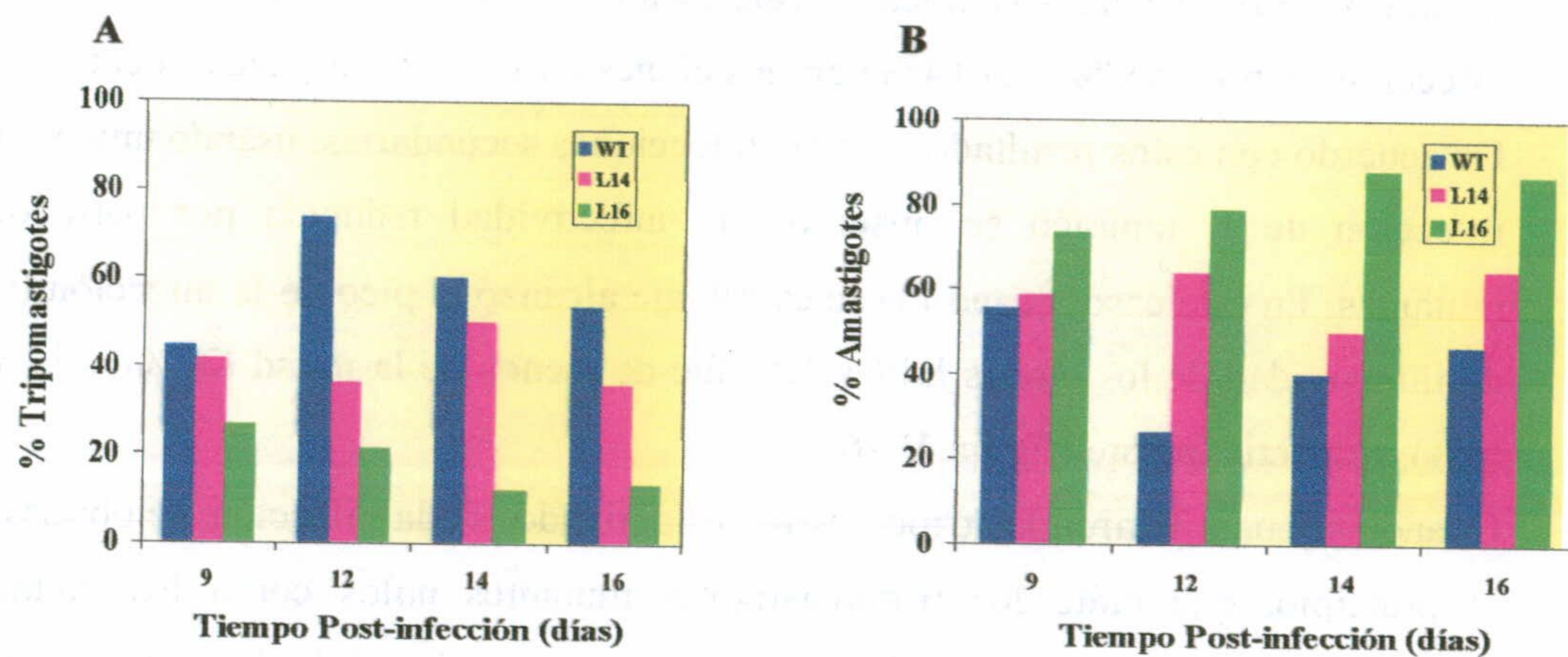


Cada línea mutante mostró una reducción significativa en la infectividad. En la infección primaria se observó que, mientras que la línea salvaje infectaba aproximadamente el 100% de las células para el día 16, las líneas mutantes apenas si mostraban infectividad detectable (figura V 26A). Cuando la línea salvaje alcanzaba el 100 % de infectividad, las tasas de infección fueron de 9% y un 14% para los clones L14 y L16, respectivamente.

De acuerdo con estos resultados, en las infecciones secundarias, usando una multiplicidad de infección de 1, también se observó una infectividad reducida por parte de las líneas mutantes. En este caso, cuando la línea salvaje alcanzó el pico de la infección (60%), la tasa de infectividad de los clones L14 y L16 fue de menos de la mitad (27%) y 13 veces menos (4%), respectivamente (figura V 26C).

Cuando se cuantificaron los tripomastigotes derivados de la infección, se observó, sobre todo al principio, que tanto los tripomastigotes mutantes nulos como los mutantes simples utilizados en la infección secundaria, repetían el patrón de salida de la infección de la que se obtuvieron, volviendo a liberar tripomastigotes al sobrenadante en una proporción similar a lo obtenido en la infección primaria, y diferente a la proporción de parásitos liberados por la cepa salvaje. La proporción relativa de parásitos liberados hacia el día 9 en la infección primaria fue del 50.6%, 36.9% y 12.3% entre las líneas salvaje, mutantes simples, y mutantes nulos, respectivamente. En la infección secundaria hacia el día 12 se obtuvieron proporciones del 52.17%, 39.1% y 8.7% para los parásitos salvajes, mutantes simples, y mutantes nulos, respectivamente (figuras V 26B y D). Se eligieron esos momentos en cada infección por ser los primeros tiempos de salida significativa de parásitos al exterior, evitando los tiempos posteriores en los que se producen nuevas infecciones.

También se observó en infecciones a largo plazo que, respecto al número total de parásitos presentes en el sobrenadante, existía una gran proporción de amastigotes en las cepas mutantes, mientras que en la línea salvaje el estadio mayoritario en el sobrenadante era el de tripomastigote (figura V.27).



**Figura V.27.- Predominio de estadio en el sobrenadante de las infecciones secundarias.**

En (A) se muestra el porcentaje de tripomastigotes en el sobrenadante de infecciones llevadas a cabo por parásitos salvajes (WT), mutantes simples (L14), y mutantes nulos (L16), en comparación al porcentaje de amastigotes en las mismas condiciones (B).

En el día 12 de la infección, mientras que el 73 % de los parásitos en el sobrenadante eran tripomastigotes (figura V 27A) en la línea salvaje, aproximadamente el 78.6% para el mutante nulo, y el 64% para el mutante simple, eran amastigotes (figura. V 27B).

#### V.4.1.2 Acontecimientos intracelulares ocurridos en la invasión.

Uno de los momentos clave en el ciclo de vida del parásito es el que se presenta cuando tiene que escapar de la vacuola fagolisosómica que se formó en el momento de su entrada en la célula. Se ha propuesto la intervención de proteínas que parecen ser funcionalmente parecidas a la porina del complemento. Estas proteínas producirán poros en la membrana de la vacuola, quedando los parásitos libres en el citosol, donde terminarán de transformarse a amastigotes, y continuarán su proceso infeccioso. Los ensayos de infección y hemolíticos han mostrado que la deficiencia en *LYT1* produce una disminución significativa en la actividad lítica del parásito y, posiblemente debido a esto, en su infectividad. Esta observación puede



sugerir un papel de *LYT1* en el escape del parásito de la vacuola hacia el citoplasma de la célula huésped, en el contexto de proteínas de tipo porina.

En este sentido se realizó un experimento de infección con los mutantes nulos y los parásitos salvajes y a través de un análisis de inmunofluorescencia con reactivos específicos (descritos en material y métodos, apartado V.2.3.9), se quiso determinar el momento del ciclo en el que se establecía la diferencia en la infección entre ambas cepas. Se utilizaron anticuerpos específicos de la superficie del trypanosoma, y de la membrana de los lisosomas de la célula hospedadora, como anticuerpos primarios; y anticuerpos conjugados con Rhodamina o Fluoresceína, respectivamente, como anticuerpos secundarios.

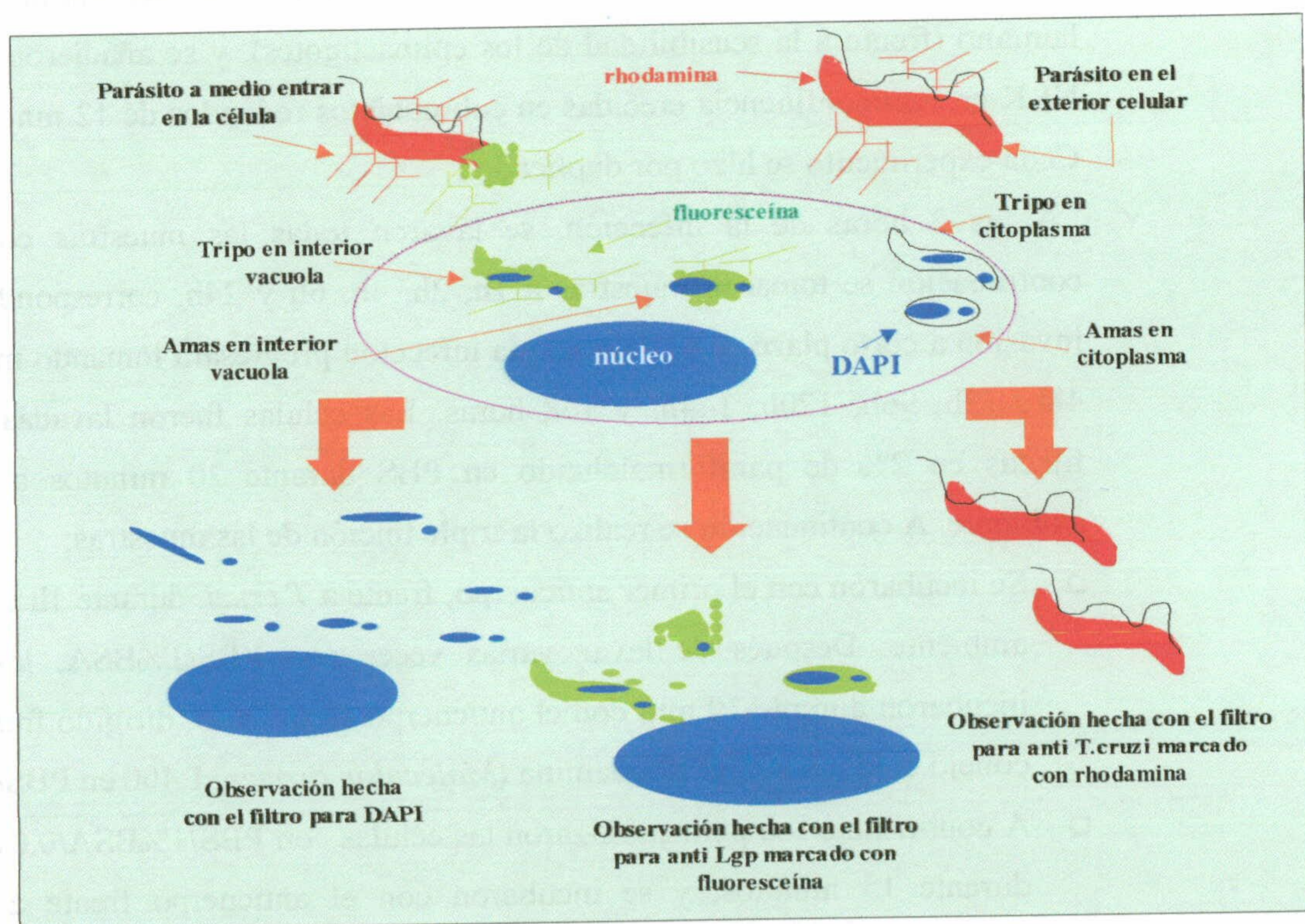


Figura V.28.- Representación esquemática del análisis de las infecciones por inmunofluorescencia.





El marcaje con DAPI permitió identificar el DNA de los parásitos y de las células. Con este triple marcaje es posible e identificar y diferenciar parásitos fuera de las células hospedadoras (se teñirán de rojo y con DAPI), entrando en el fibroblasto (se teñirán la mitad de verde y la mitad de rojo, y con DAPI), en el interior de la vacuola parasitófora (se teñirán de verde y con DAPI), o libres en el citosol (solo se teñirán con DAPI), como se representa en la figura V 28. El marcaje con DAPI permite también determinar los estadios del parásito, ya que la forma del núcleo es diferente en tripomastigotes metacíclicos (alargado) y amastigotes (redondeado).

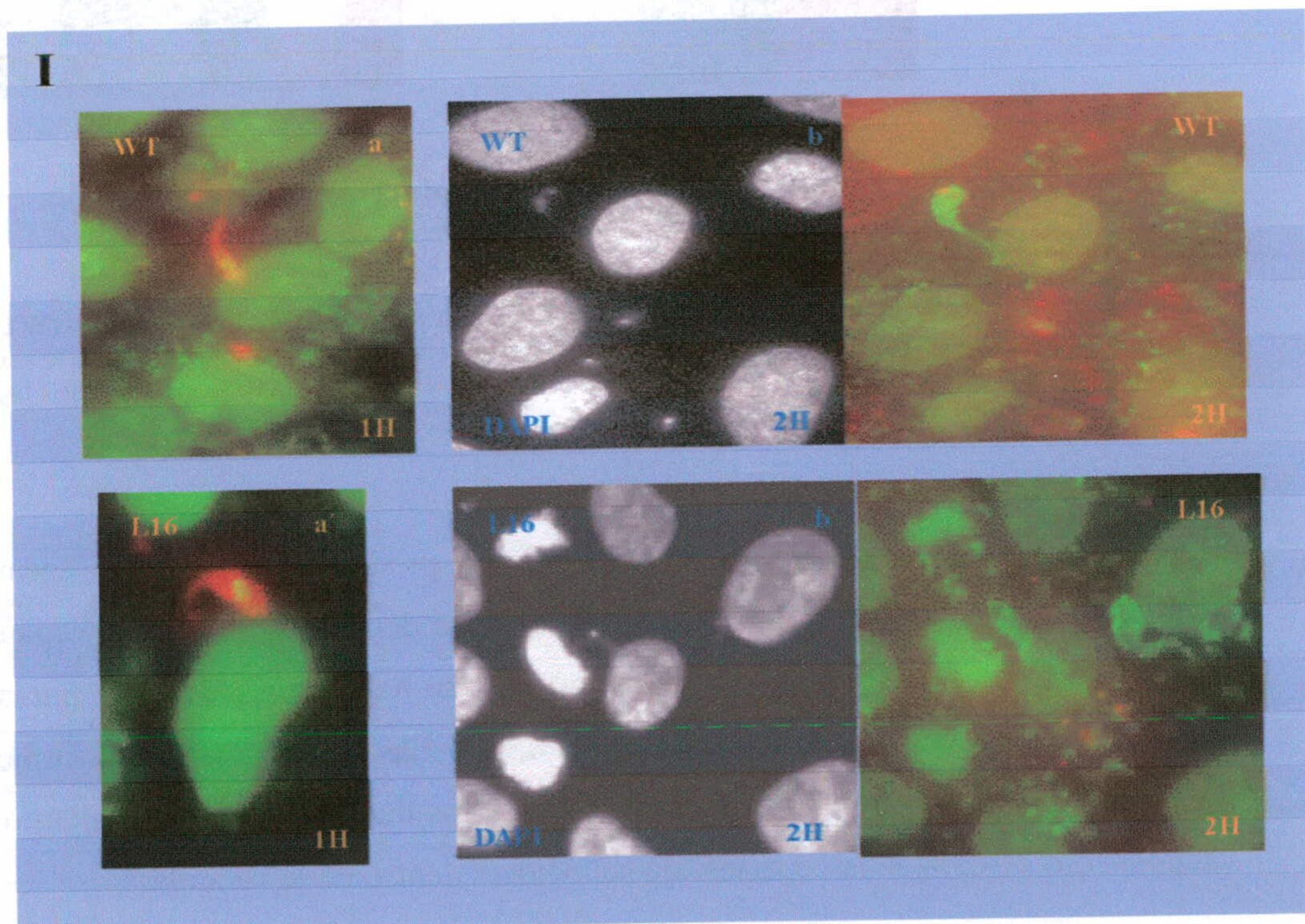
- ✓ Las infecciones fueron llevadas a cabo con tripomastigotes metacíclicos (a una concentración de  $1.5 \times 10^7$  parásitos/ml) derivados de epimastigotes de la línea salvaje y de los mutantes nulos. Se purificaron por su resistencia al complemento humano (frente a la sensibilidad de los epimastigotes), y se añadieron a las células NRK en semiconfluencia crecidas en cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro. Cada experimento se hizo por duplicado.
- ✓ A las 2 horas de la infección, se lavaron todas las muestras con PBS<sup>++</sup>. A continuación se tomaron muestras a 1h, 2h, 4h, 6h y 24h, correspondientes a una invasión a corto plazo, y se dejó que la infección progresara tomando muestras a las 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, y 168 horas. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas en 2% de paraformaldheido en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó la triple tinción de las muestras:
  - Se incubaron con el primer anticuerpo, frente a *T. cruzi*, durante 1h a temperatura ambiente. Después de lavar varias veces con PBS/1%BSA, las células se incubaron durante 30 min con el anticuerpo secundario, dirigido frente a IgG de conejo conjugado con Rhodamina (*Molecular Probes*, 1:400 en PBS/1%BSA).
  - A continuación se permeabilizaron las células con PBS/1%BSA/0.01% saponina durante 15 minutos, y se incubaron con el anticuerpo frente a la proteína lisosomal Igp 120 (1:50 en PBS 1% BSA/0.01% saponina) durante 1hora a temperatura ambiente.
  - Después de lavar las células en PBS/1%BSA/0.01% de saponina, se incubaron con un anticuerpo frente IgG de cabra conjugado a Fluoresceína (1:200 en PBS/1%BSA/0.01% saponina) durante 30 minutos. Se lavaron de nuevo las

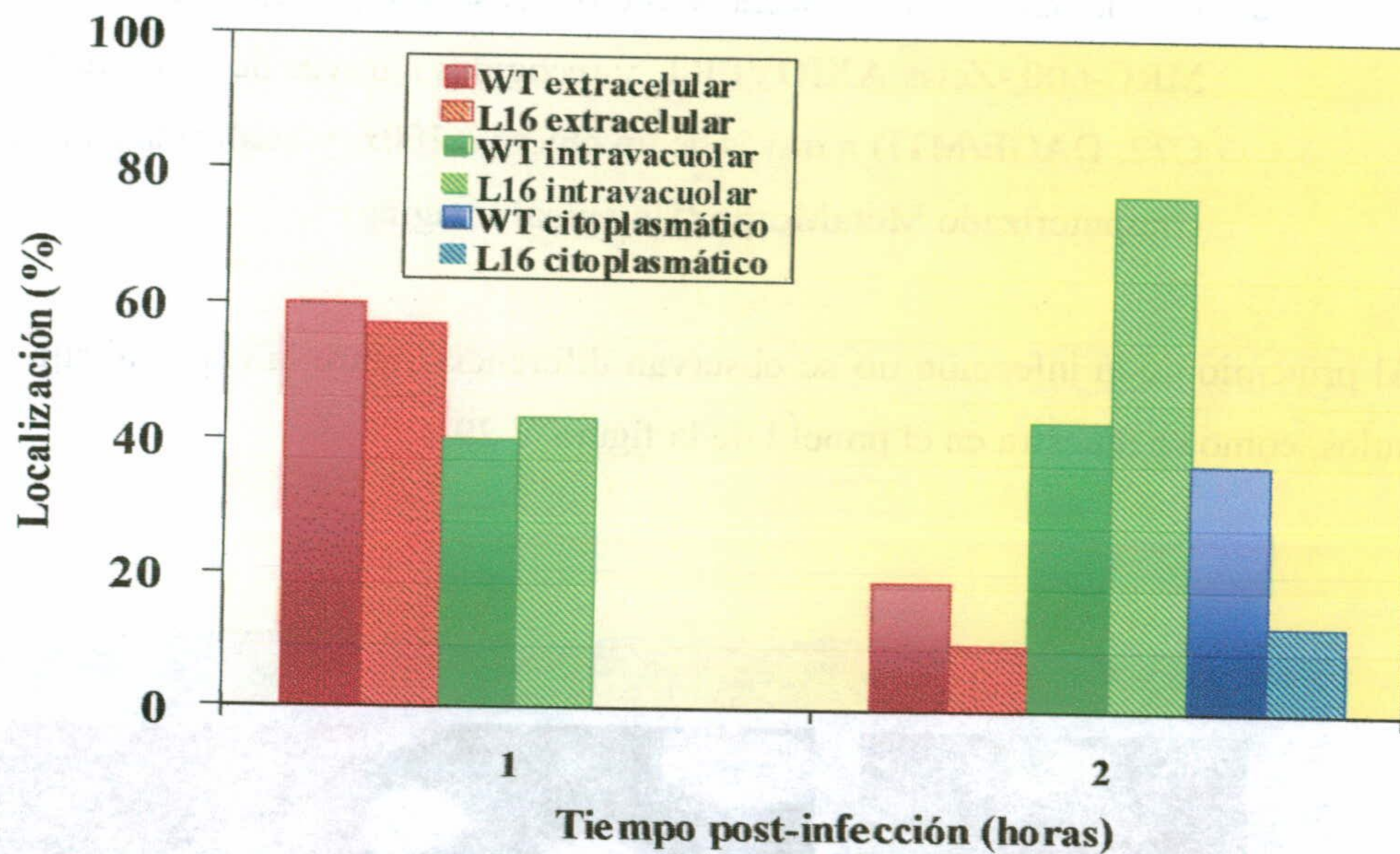


muestras y se incubaron con DAPI (25 ugr/ml) durante 1 minuto. Las muestras se montaron con una gota de Mowiol.

- Las imágenes fluorescentes fueron observadas bajo un microscopio Bio-Rad MRC-600 -Zeiss AXIOVERT, y recogidas a través de una video cámara (CCD-C72; DAGE/MTI) a través de un objetivo 100x, y analizadas a través del sistema computerizado MetaMorph (Universal Imaging).

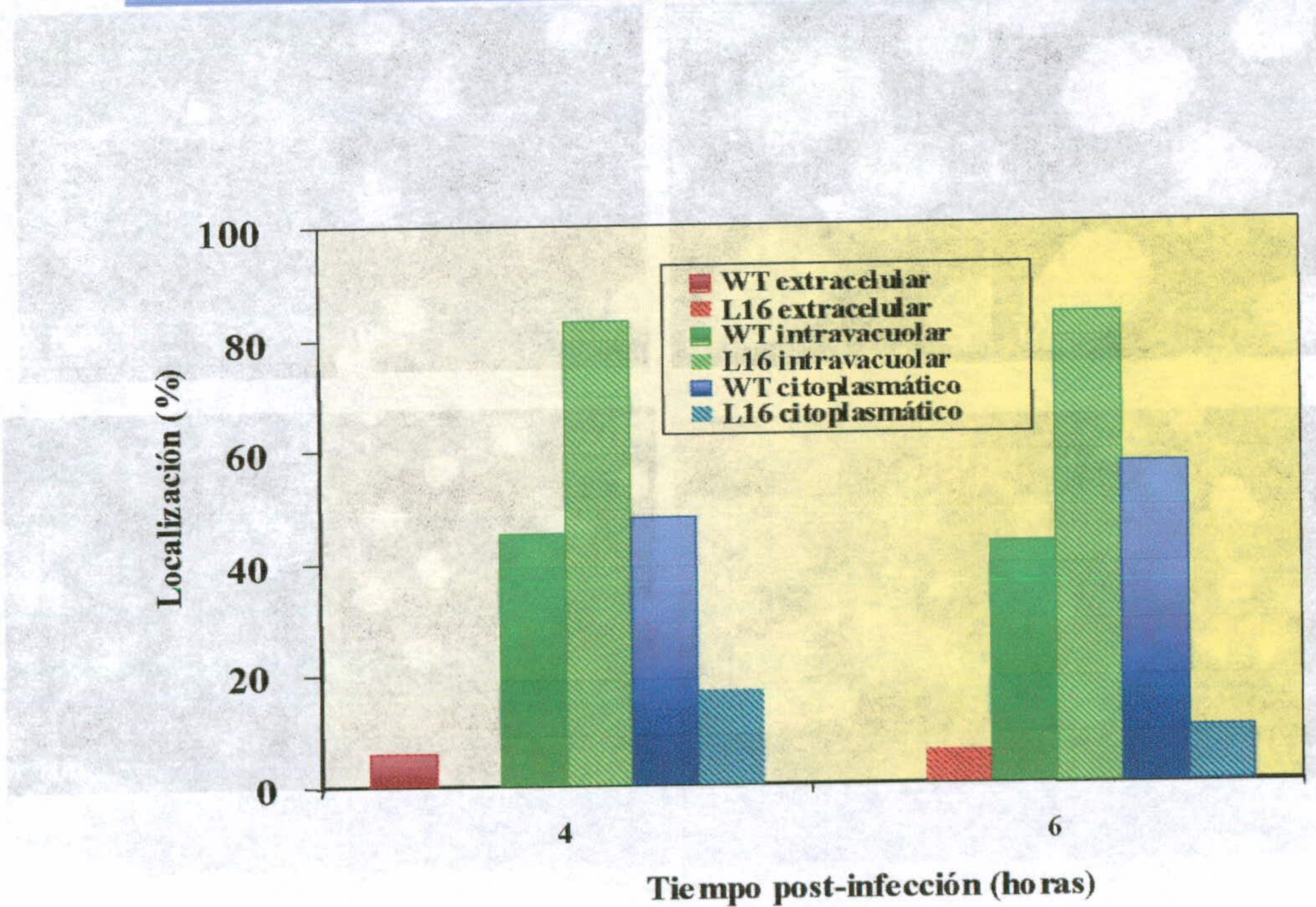
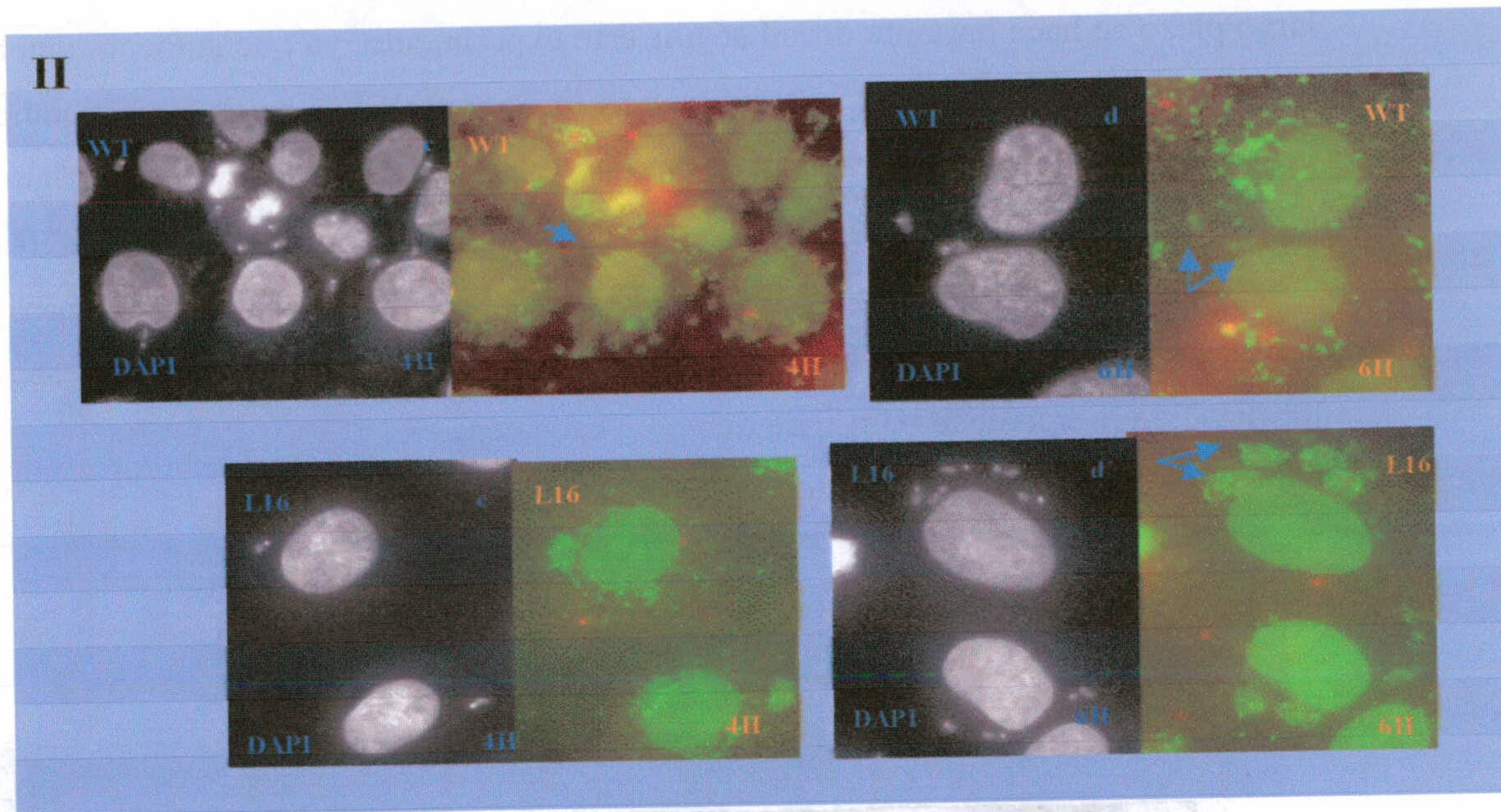
Al principio de la infección no se observan diferencias entre la cepa salvaje y los mutantes nulos, como se muestra en el panel I de la figura V 29.





**Figura V.29.I- Infección temprana de células NRK con parásitos de la línea salvaje (WT) y mutantes nulos (L16) de la cepa Cl. Brener.** Al principio de la infección no existen diferencias entre ambas líneas de parásitos (a,a). A las 2 horas el número de parásitos contabilizados en el interior de vacuolas fagolisosómicas es mayor en L16 que en WT (b,b).

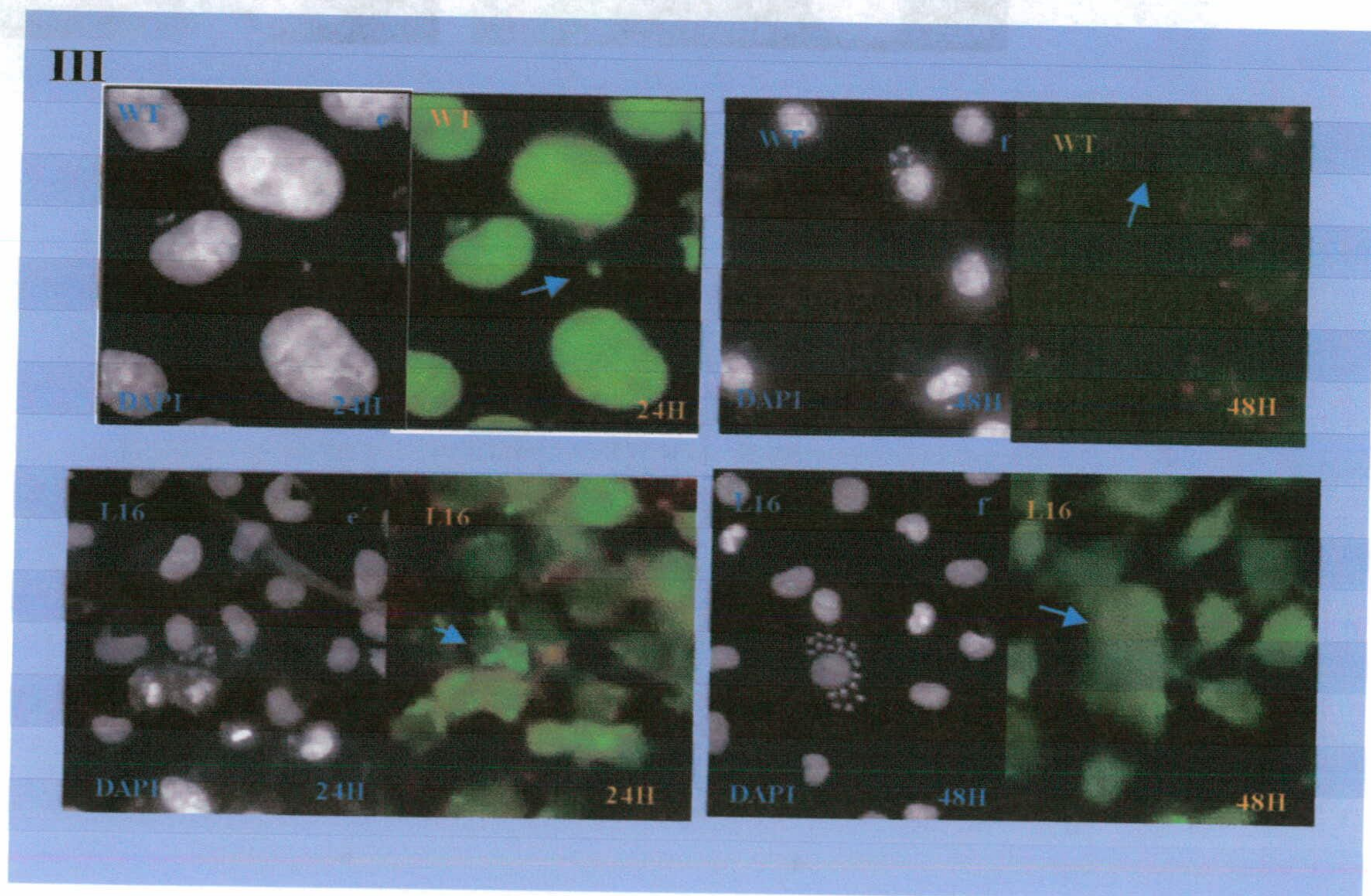
Sin embargo, después de 4 horas, las infecciones producidas por ambas líneas de parásitos empiezan a ser distintas: mientras que casi la mitad de los parásitos de la cepa salvaje se han liberado al citosol, el 83% de los mutantes nulos se hallan en la vacuola parasitófora. Las diferencias se hacen más pronunciadas conforme la infección progresa. A las 6 horas, mientras que el 84% de los mutantes nulos se hallan retenidos en la vacuola solo el 43% en la cepa salvaje se localiza dentro de la vacuola.

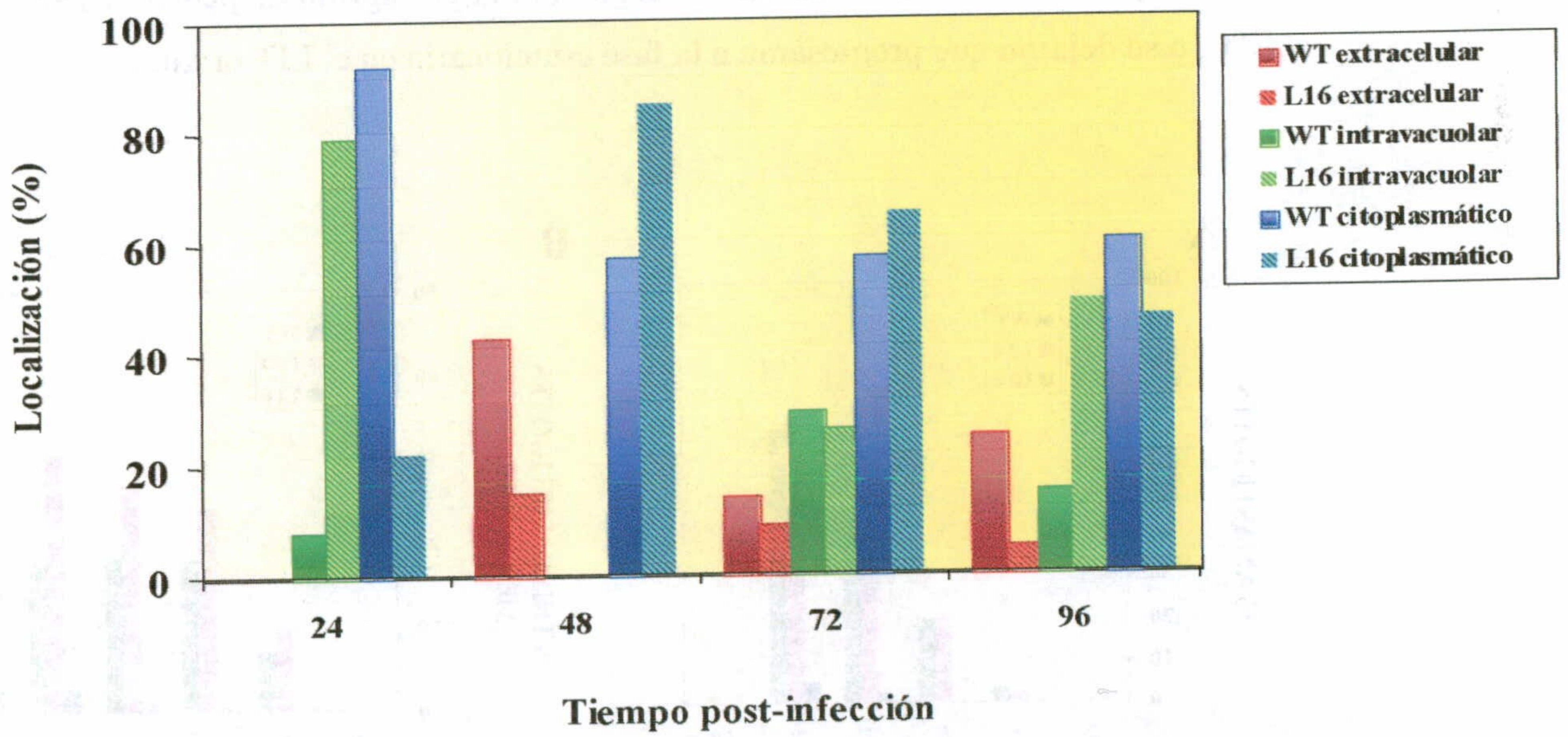
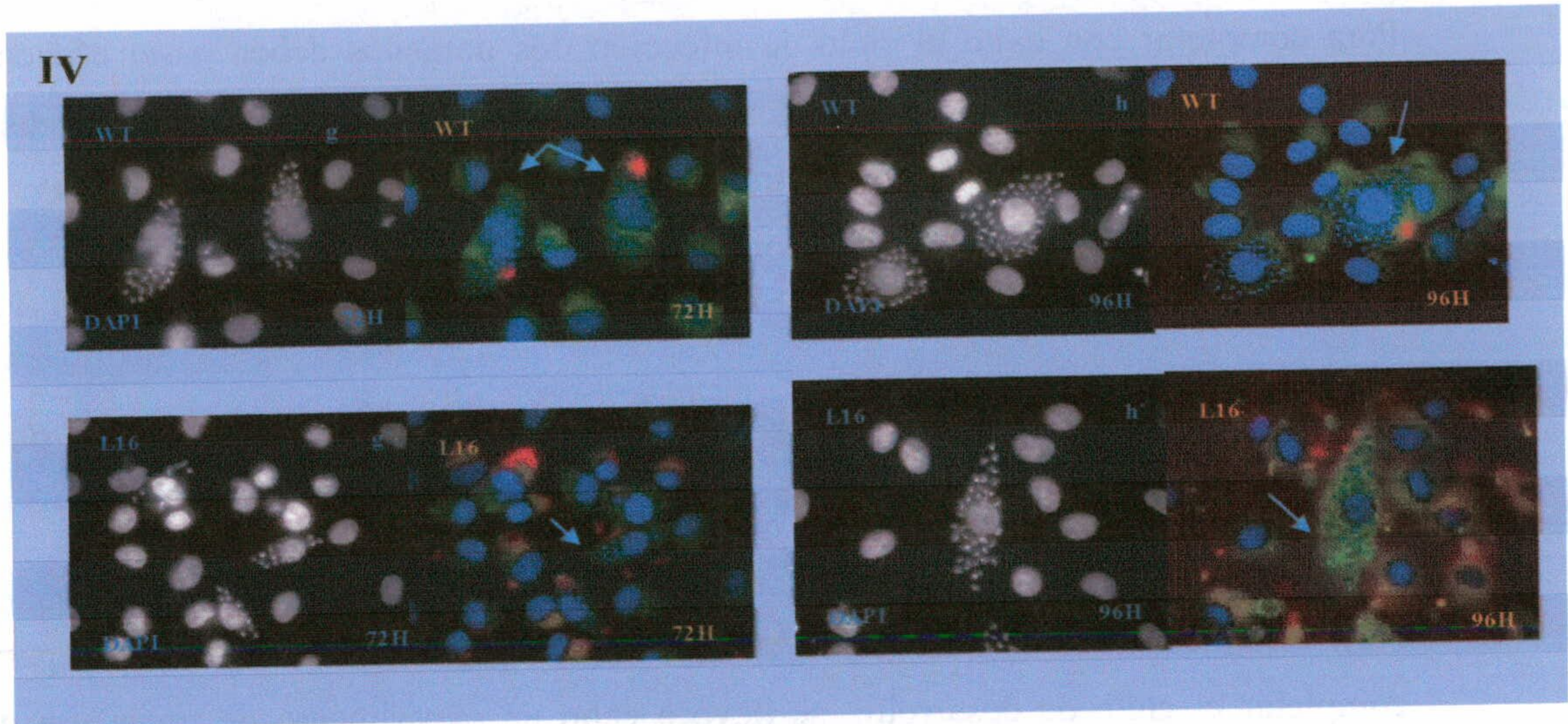


**Figura V.29.II- Retención de los mutantes nulos en la vacuola fagolisosómica.** A las 4 horas de la infección se observa que la mayoría de los parásitos mutantes nulos se hallan en el interior de la vacuola, mientras que los parásitos salvajes se localizan en el citosol (c,c'). La situación se mantiene a las 6 horas (d,d').



En la figura V 29, panel III y panel IV, se muestra el progreso de las infecciones (aunque a largo plazo se hace bastante difícil seguir este experimento, ya que aumenta mucho el fondo inespecífico debido a que se solapan nuevas infecciones). Los datos correspondientes a este experimento se pueden observar de forma más clara en las gráficas de cada figura donde se representa la proporción relativa de parásitos en los diferentes ambientes (extracelular, intravacuolar, intracitoplásmático fuera del lisosoma) para los mutantes nulos y la cepa salvaje, en los diferentes tiempos del experimento. Las imágenes corresponden a la localización preferencial para cada tiempo y cada cepa.





**Figura V.29.III y IV-Progreso de las infecciones a largo plazo.** A las 48 horas de la infección se observan células con una proporción de parásitos mutantes nulos en el citosol (f,f'). A partir de las 72 horas, las células aparecen repletas de parásitos en el caso de la línea salvaje (g,g') y empiezan a superponerse las infecciones (h,h').

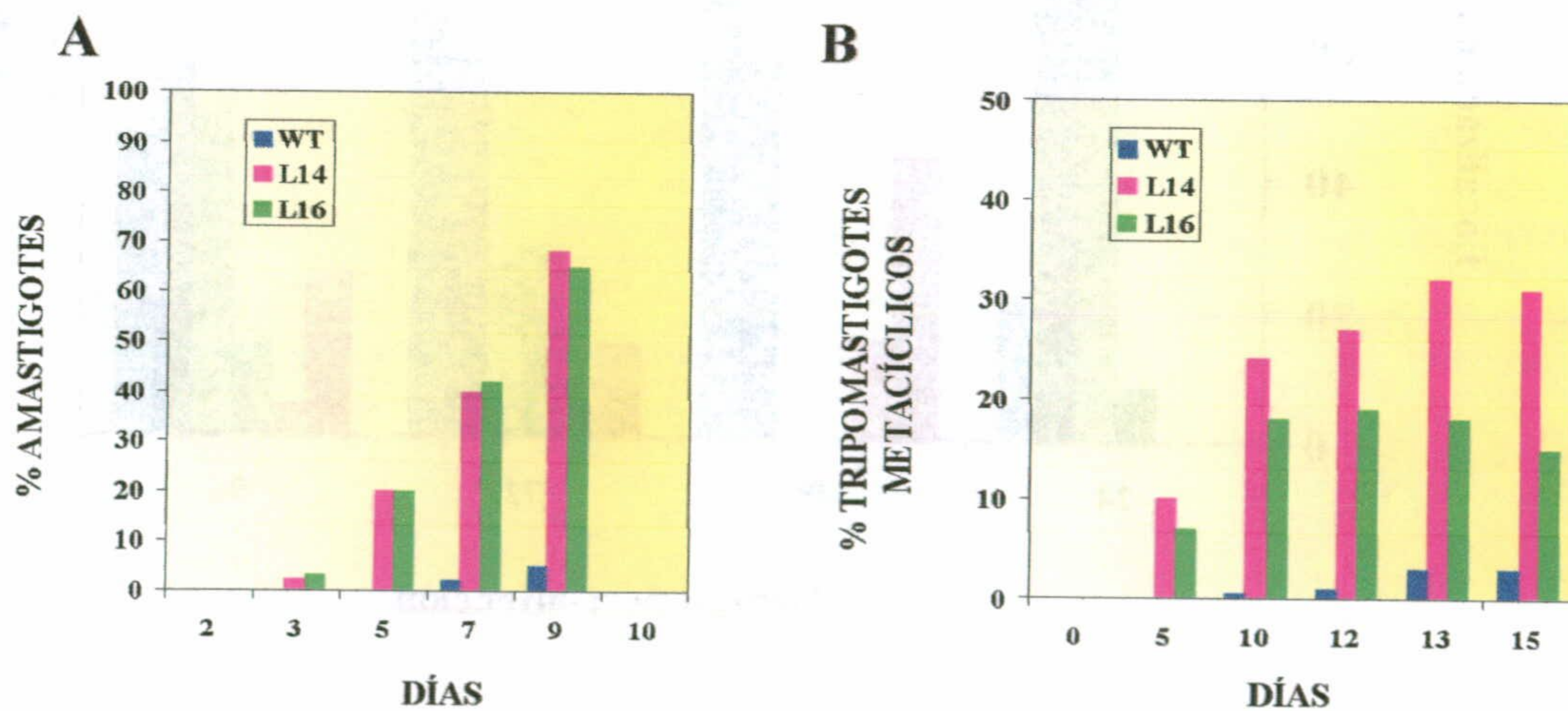


#### V.4.2 Participación de *LYT1* en el ciclo de vida del parásito.

Para completar con éxito el ciclo de infección, los parásitos deben pasar eficientemente a través de diferentes estadios de desarrollo. Consecuentemente se podía pensar que la infectividad reducida de los parásitos deficientes en *LYT1* podía haber sido un efecto indirecto de la incapacidad de los mutantes para completar su ciclo de vida.

##### V.4.2.1 Influencia del gen *LYT1* en los procesos de cambio de estadio durante el ciclo de vida de *T. cruzi*

Para determinar cómo la mutación en *LYT1* podría afectar la capacidad del parásito para completar el ciclo de desarrollo, se llevó a cabo un experimento de transición de estadio. Epimastigotes en fase semilogarítmica, procedentes del medio LIT, fueron transferidos a DMEM suplementado con 2% de SBF, 1% glutamina y 5 ugr/ml de penicilina/Streptomocina a 37°C, o se dejaron que progresaran a la fase estacionaria en el LIT original.



**Figura V.30-La delección del gen *LYT1* acelera el cambio de estadio *in vitro*.** La eficiencia en el cambio de estadio de epimastigotes de la línea salvaje (WT), el mutante simple (L14) y el mutante doble (L16), se determinó por su capacidad para convertirse en amastigotes extracelulares en medio DMEM (A) o en tripomastigotes metacíclicos en medio LIT (B).



Se tomaron muestras diariamente y se contabilizó la proporción relativa de epimastigotes, amastigotes, y metacíclicos para las cepas mutantes y la salvaje, a través de observación al microscopio. Los resultados presentados en la figura V 30A muestran que, después de ser transferidos a DMEM, las líneas mutantes se convierten rápidamente en parásitos semejantes a amastigotes extracelulares caracterizados por una forma casi esférica y por la pérdida visible del flagelo así como por el hecho de que fueron cuantitativamente precipitados por el anticuerpo monoclonal 2C2B6, específico para el antígeno Ssp-4 de superficie de amastigotes. Para el momento en que los parásitos de la cepa salvaje alcanzan un 5% de la transformación (día 9), las líneas mutantes presentan aproximadamente un 68% (L14) y un 65% (L16).

Resultados similares se obtuvieron cuando se dejaron progresar epimastigotes hacia la fase estacionaria en medio LIT original (figura V 30B). Las líneas mutantes se convirtieron rápidamente en tripomastigotes metacíclicos para el día 13, con un 32% en la cepa L14 y un 18% en L16, mientras que en la cepa salvaje fue menos del 3%. El experimento se mantuvo durante un tiempo, en el que el título completo de cada cultivo continuó aumentando, eliminando la posibilidad de que los epimastigotes mutantes fueran menos viables en DMEM que los epimastigotes salvajes





## **V.5 RECONSTITUCIÓN DIFERENCIAL DE LOS MUTANTES NULOS**

Como se ha podido comprobar, las deficiencias en *LYT1* originan múltiples fenotipos en los parásitos mutantes. El hecho de que se produzca un fenómeno de “*splicing*” alternativo que da lugar a RNAm diferentes capaces de producir potencialmente dos formas derivadas de la proteína, una forma completa y una forma sin la secuencia señal aminoterminal, podría explicar los diferentes fenotipos asociados.

Para intentar resolver la posibilidad de que cada forma de la proteína estuviera asociada a un fenotipo diferente, se realizó una transformación en los mutantes nulos con construcciones que expresaban de forma única o la forma completa de la proteína o la forma que no presenta la secuencia señal.

### **V.5.1 Construcción del sistema de expresión en pTEX $ble$ .**

Para la expresión diferencial de las formas de la proteína *LYT1* completa (*LYT1*) y sin el primer ATG de la pauta abierta de lectura del gen (*LYT1 $\delta$ atg*) en epimastigotes de *T. cruzi*, se utilizó el vector de transfección pTEX $ble$  (5.6 Kb). El vector posee el gen *ble* que codifica la resistencia para la Phleomicina, permitiendo la selección de los transformantes mediante la adición del antibiótico a la concentración adecuada.

A partir del clon pGEM5Zf(+)*LYT1*-5.8, por un lado se amplificó por PCR el gen *LYT1* completo utilizando los cebadores Artx-8 y Artx-6, y, por otra parte, el mismo fragmento pero sin el primer ATG utilizando los cebadores Artx5 y Artx6. El cebador Artx-8 se diseñó en el extremo 5' del gen incluyendo el ATG iniciador e introduce un sitio de restricción *Bam*HI. El cebador Artx-5 se diseñó también en el extremo 5' del gen pero no incluía el primer ATG. También presenta un sitio de restricción *Bam*HI. Artx-6 se diseñó 65 nucleótidos corriente abajo del terminador del gen e incluye un sitio de corte para la enzima de restricción *Eco*RI. Para la amplificación se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- 1 minuto a 94°C, 3 minutos a 30°C y 2.5 minutos a 72°C durante 10 ciclos; 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 44°C y 2.5 minutos a 72°C durante otros 10 ciclos, cuando se usaron Artx-8 y Artx-6.



- 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 28°C, y 2 minutos a 72°C durante 10 ciclos; y 10 ciclos más con las mismas condiciones pero con una temperatura de hibridación de 45°C, cuando se usaron Artx-5 y Artx-6.

Los productos LYT1 (de 1742 pb) y LYT1 $\delta$ atg (1739 pb), fueron purificados y digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. Los productos de las digestiones se sometieron a electroforesis en gel del 1% de agarosa y tras ser purificados por *Gene clean*, se clonaron, en primer lugar, de forma direccional en los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI del polilinker del vector pRIBOTEX, tras ser éste digerido con las mismas enzimas y purificado de igual forma. La ligación se realizó durante 4 horas a temperatura ambiente. Se transformaron células de *E. coli* competentes, que se plaquearon sobre LB con ampicilina. DNA extraído de cultivos originados a partir de colonias resistentes se analizó mediante digestión con *Bam*HI y *Eco*RI. (figura V.31).

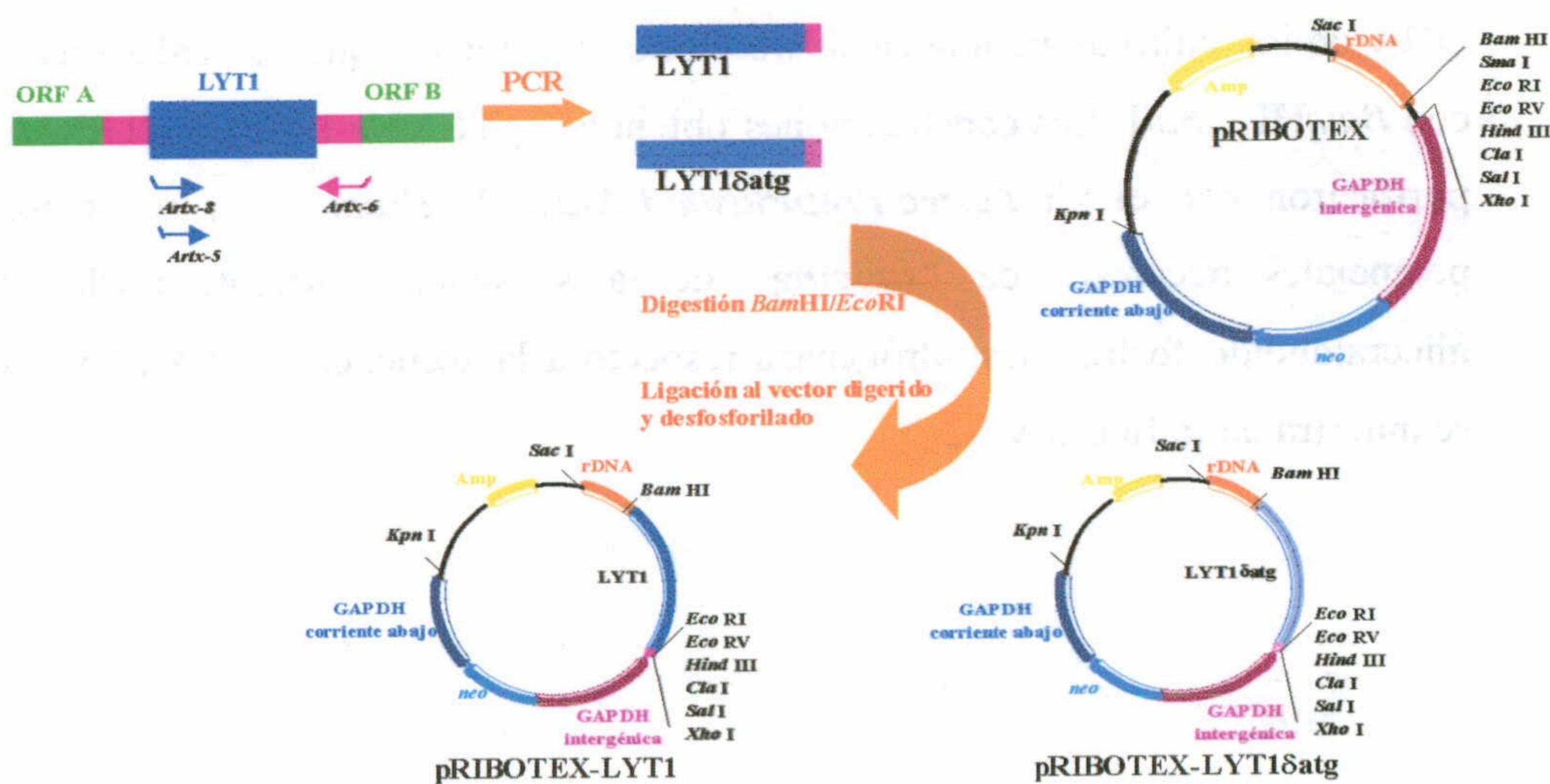


Figura V.31.- Construcción del vector de expresión pRIBOTEX-LYT1 y pRIBOTEX-LYT1 $\delta$ atg. Etapas seguidas para la expresión de LYT1 y LYT1 $\delta$ atg en el vector de expresión pRIBOTEX. Se indican los diferentes elementos integrados en el vector y el sitio de clonaje múltiple antes y después de la introducción de los insertos.



La expresión en *T. cruzi* del gen CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) clonado en pRIBOTEX había sido descrita como 16.000 veces superior a la expresión del mismo gen usando pTEX [Martínez-Calvillo y col., 1997]. Ya que se quería utilizar una expresión lo más fisiológica posible a la hora de estudiar el proceso de reconstitución de los fenotipos en los parásitos mutantes, y puesto que estos habían sido generados con plásmidos que conferían resistencia a higromicina y neomicina, se planteó la posibilidad de utilizar el plásmido de expresión pTEXble.

Los clones obtenidos, pRIBOTEX-LYT1 y pRIBOTEX-LYT1 $\delta$ atg, así como el vector pTEXble, se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I. Los productos de las digestiones se separaron electroforéticamente en un gel del 1% de agarosa, se purificaron los DNAs por *Gene clean*, y se realizaron las ligaciones durante 4 horas a temperatura ambiente. Células de *E. coli* transformadas fueron plaqueadas sobre LB con ampicilina. Se extrajo DNA de los cultivos pertenecientes a clones resistentes, que se analizó mediante digestión con *Bam*HI y *Sal*I. Las construcciones obtenidas, pTEXble-LYT1 y pTEXble-LYT1 $\delta$ atg, se purificaron con el kit *PerfectPrepPlasmid Maxi* de *Promega*, y se analizaron los sitios potenciales aceptores de "splicing" de la secuencia corriente arriba del gen de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa respecto a la secuencia de LYT1 y LYT1 $\delta$ atg, como se muestra en la figura V 32.





### V.5.2 Transfección de *T. cruzi* con pTEXble-LYT1 y pTEXble-LYT1 $\delta$ atg.

Se lavaron tres veces con PBS y en frío  $9.6 \times 10^8$  epimastigotes, y se resuspendieron en 1.6 ml de tampón HBS (para obtener una concentración final de  $6 \times 10^8$  células/ml). En cubetas de electroporación previamente enfriadas, se mezclaron 0.4 ml ( $2.4 \times 10^8$ ) de células con 50  $\mu$ l de DNA plasmídico (2 mgr/ml), y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Se electroporaron los epimastigotes con las construcciones pTEXble-LYT1, pTEXble-LYT1 $\delta$ atg, pTEXble, y TE como control de transfección. Las condiciones de electroporación fueron 500 V de resistencia/capacitancia, 360 V de carga, R1 = 13 ohms, y 1500  $\mu$ F. Los parásitos electroporados se mantuvieron durante 10 minutos en hielo, tras lo cual se añadieron a 10 ml de medio LIT con 10% de SBFi sin antibiótico. Se incubaron en estas condiciones durante 24 horas a 28°C sin agitación, y al cabo de ese tiempo se añadió phleomicina a una concentración final de 550  $\mu$ g/ml. A los 45 días el control murió y los parásitos con las construcciones comenzaron a recuperarse.

### V.5.3 Análisis de parásitos transfectados.

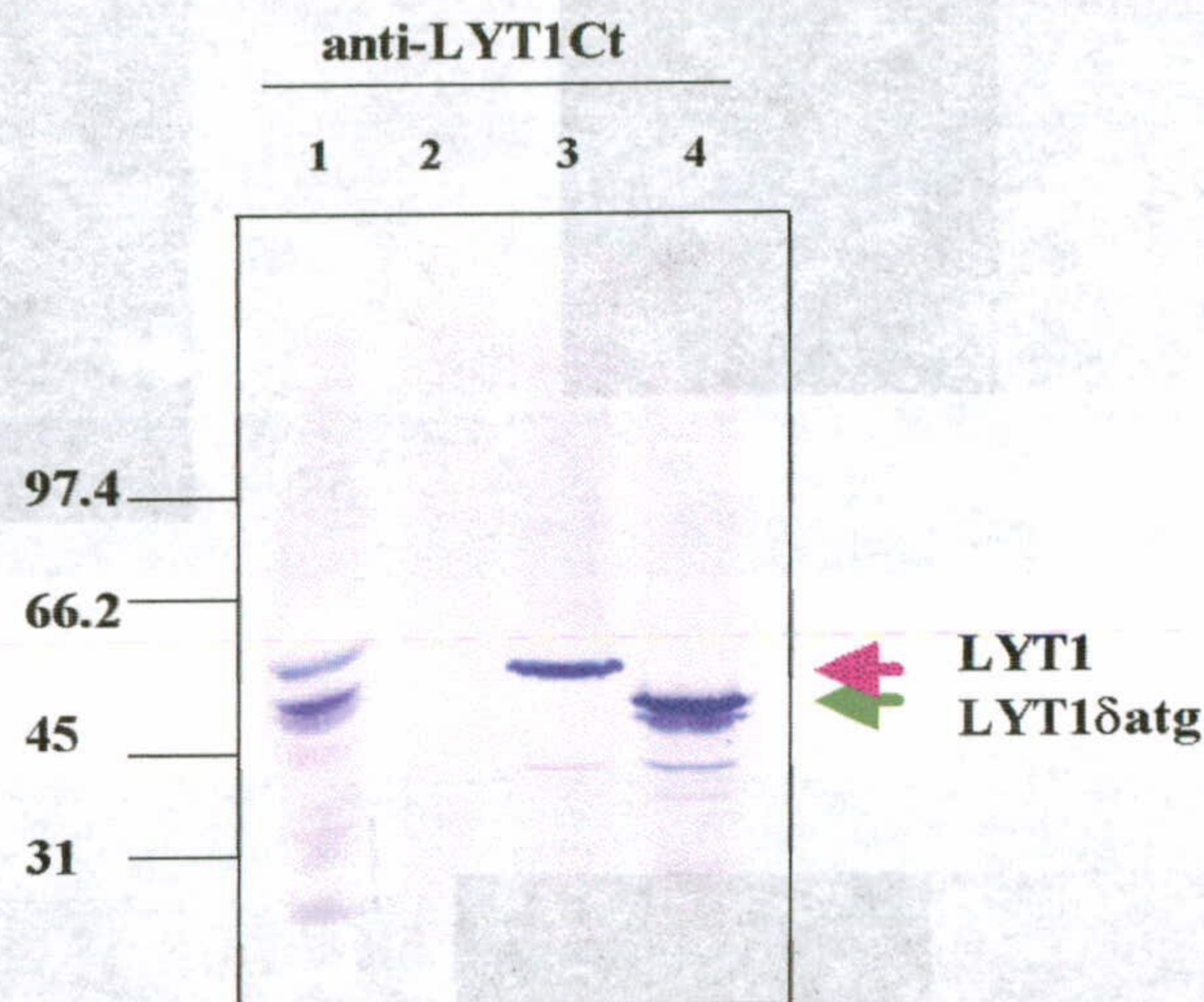
La reconstitución fenotípica de los parásitos mutantes nulos se analizó a través del estudio del proceso de cambio de estadio “*in vitro*”, de los acontecimientos ocurridos en el proceso infectivo, y de la actividad hemolítica.

#### V.5.3.1 Expresión de pTEXble-LYT1 y pTEXble-LYT1 $\delta$ atg en *T. cruzi*

El estudio de la expresión de las formas de la proteína LYT1 completa y sin el primer ATG de la pauta abierta de lectura original, se realizó por *Western blot*. Se analizaron parásitos en fase de crecimiento semilogarítmica transformados con pTEXble-LYT1, pTEXble-LYT1 $\delta$ atg, y pTEXble, que, tras ser lisados, se cargaron en un gel de acrilamida del 7.5%. Anticuerpos frente a LYT1Ct reconocieron, como aparece en la figura V 33 una banda de 60.2 KDa en los parásitos transformados con pTEXble-LYT1, mientras que en los que

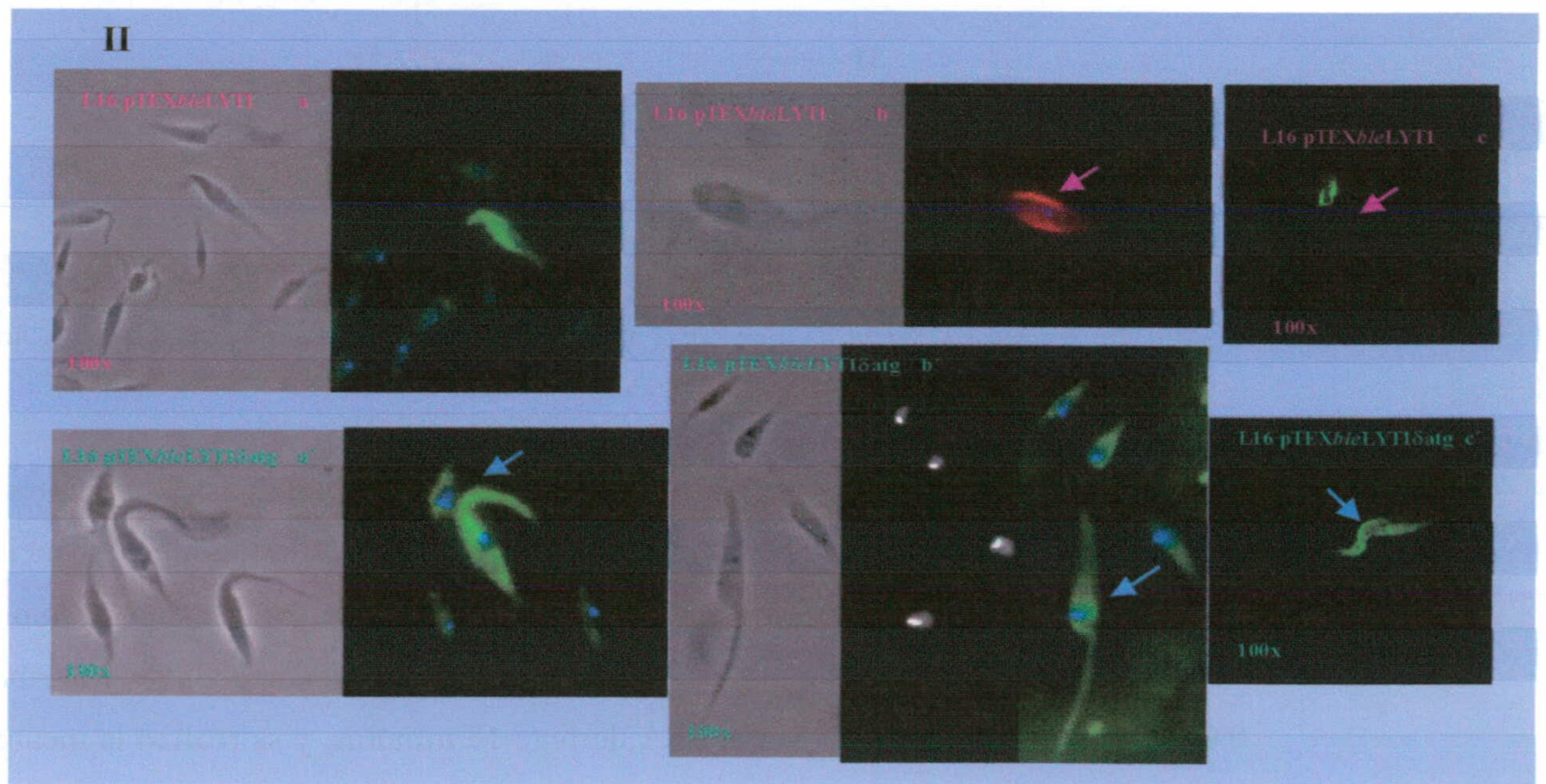
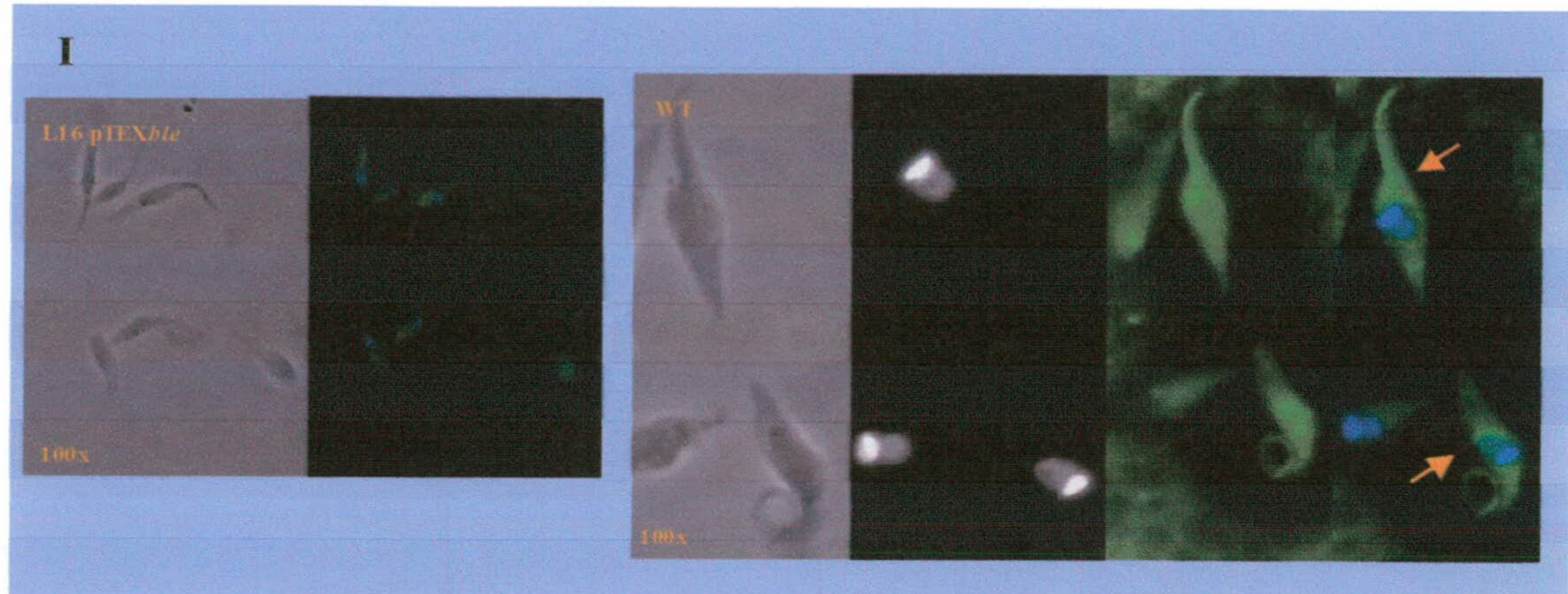


habían sido transformados con pTEX*ble*-LYT1 $\delta$ atg, se observaba una banda de 56.7 Kda y una de menor tamaño, probablemente producto de degradación de la anterior.



**Figura V.33.- Inmunodetección de las formas alternativas de expresión de LYT1.** Lisados de parásitos salvajes sin transformar (carril 1), y mutantes nulos transformados con pTEX*ble* (carril 2), con pTEX*ble*-LYT1 (carril 3) y con pTEX*ble*-LYT1 $\delta$ atg (carril 4) se cargaron en un gel de acrilamida del 7.5% y fueron analizados por *Western blot* frente a anti LYT1Ct..

La localización de las dos formas de la proteína que estaban siendo expresadas en los parásitos transfectados se llevó a cabo a través de inmunofluorescencia indirecta. Epimastigotes en fase semilogarítmica se distribuyeron en cristalillos de 12 mm de diámetro y fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS. A continuación se permeabilizaron con 0.025% de saponina en PBS y 1% BSA durante 15 minutos, y se realizó la incubación con el anticuerpo anti-LYT1Ct en ese mismo tampón (dilución 1:50). Después de lavar abundantemente, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario, conjugado a rodamina o fluoresceína (según los casos), diluido 1:400 en el tampón anterior. Tras teñir el núcleo y kinetoplasto con DAPI, se montaron las muestras sobre Mowiol y se procedió a su observación en el microscopio (figura V 34, paneles I y II).



**Figura V.34.- Inmunolocalización de las formas alternativas de expresión de LYTI.** Parásitos fijados en paraformaldehído se incubaron con anti-LYT1Ct (1/50). Como anticuerpo secundario se usó anti IgG de conejo unido a fluoresceína. En la figura I se muestra la localización en los parásitos salvajes (WT) y en los mutantes nulos transformados con pTEXble. En la figura II se muestra la localización diferencial de las formas de la proteína LYTI completa (a,b,c) y sin el primer ATG (a',b',c'). Las muestras de la figura I y las muestras a,a',b y b' de la figura II se obtuvieron a partir de un microscopio convencional, mientras que las muestras c y c' corresponden a secciones de las muestras obtenidas en un microscopio confocal



En los parásitos transformados con la construcción pTEX*ble*-LYT1, la proteína aparece localizada en la membrana plasmática, mientras que los que expresan la construcción pTEX*ble*-LYT1 $\delta$ atg, parecen localizar la proteína en el citoplasma con una marcada concentración en en la zona del flagelo, así como en el kinetoplasto. Los parásitos salvajes presentan la misma localización que los anteriores, citoplasma e interior del flagelo aunque mucho menos marcada, debido, probablemente, a la débil producción de la proteína en el estadio epimastigote.

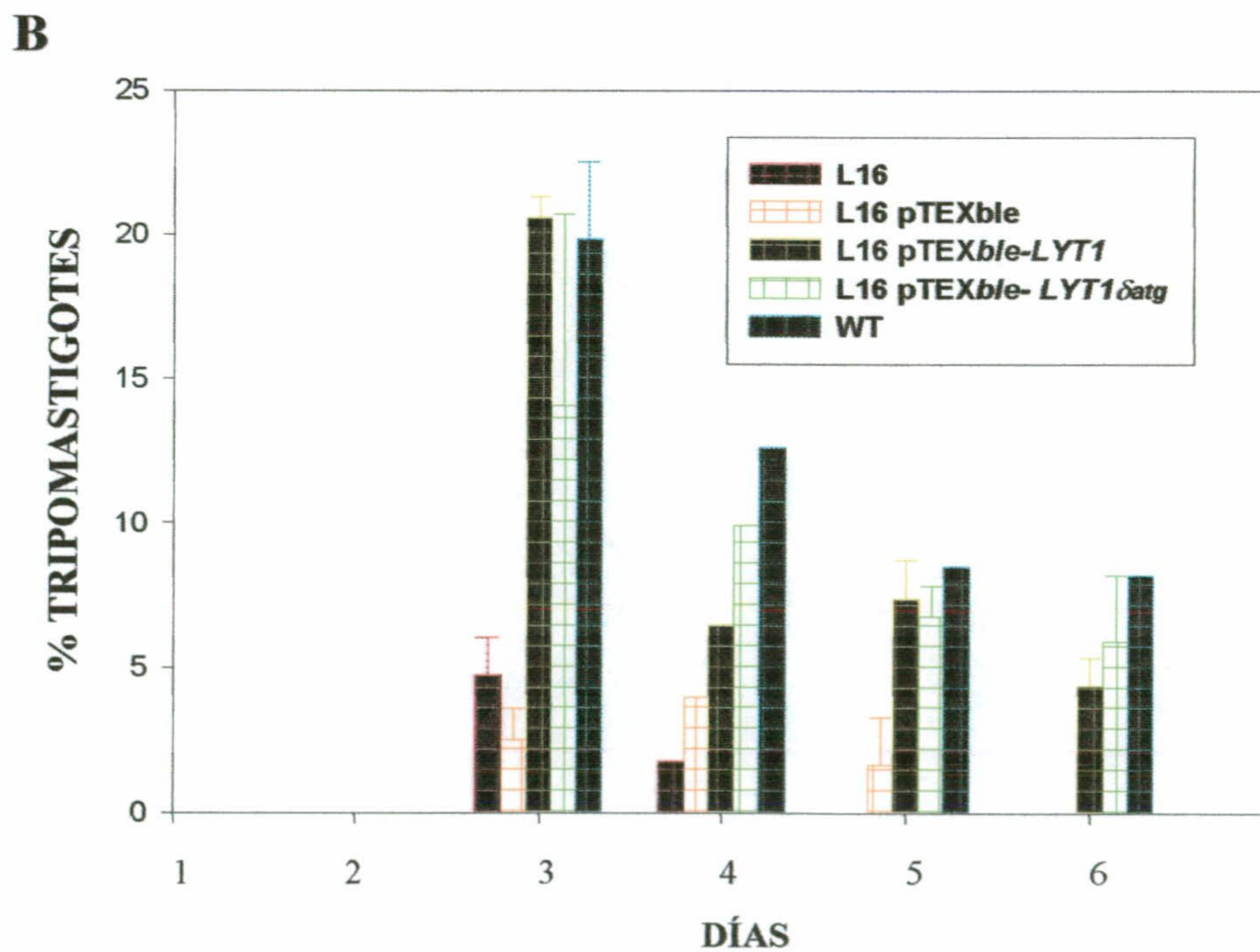
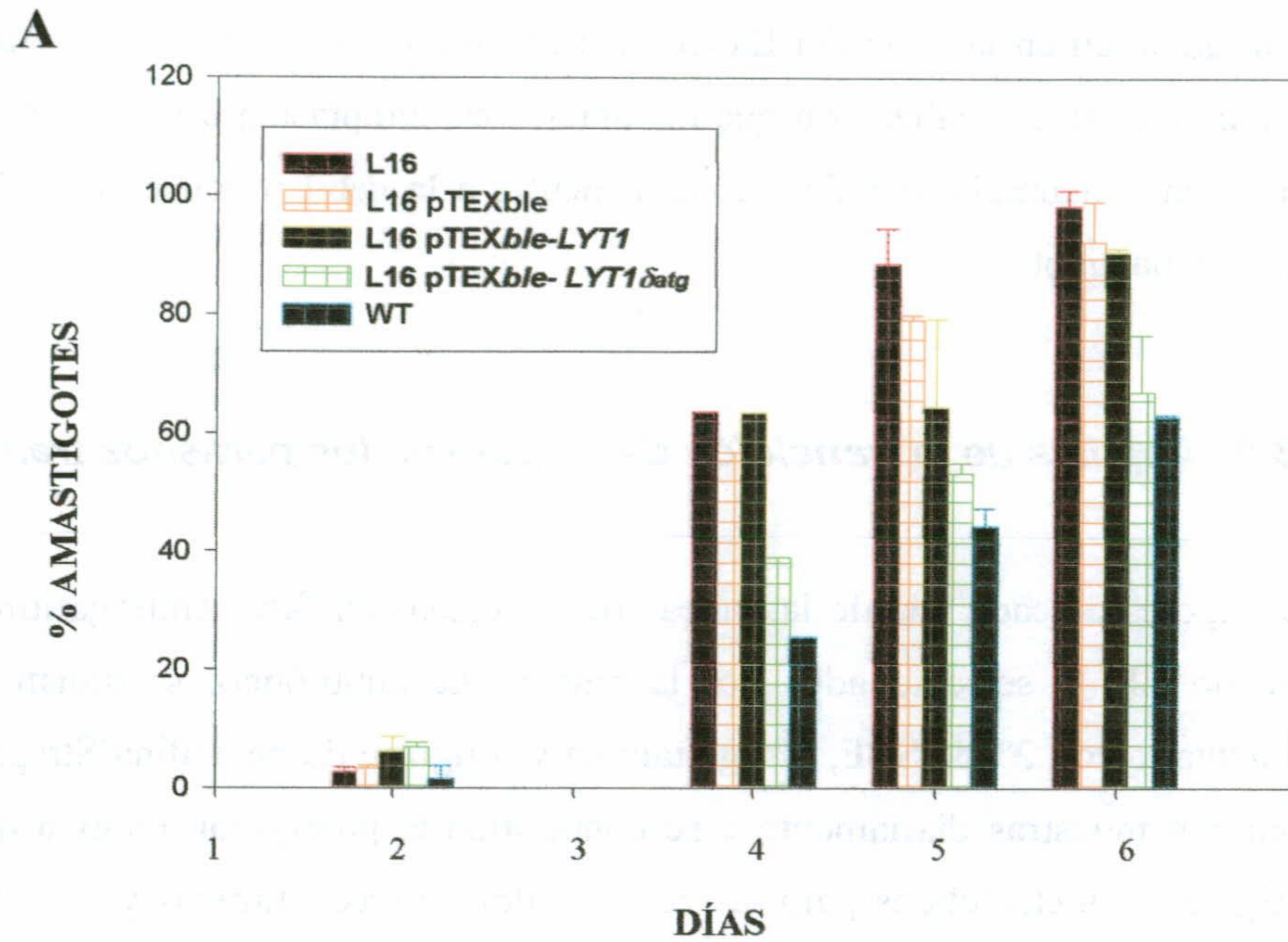
#### V.5.3.2 *Análisis de la transición de estadio en los parásitos transfectados.*

Epimastigotes de cada una de las líneas transfectadas en fase semilogarítmica, procedentes del medio LIT y seleccionados por la adición de antibiótico, se transfirieron a DMEM suplementado con 2%de SBF, 1% glutamina y 5 ugr/ml de penicilina/Streptomycin a 37°C. Se tomaron muestras diariamente y se contabilizó la proporción relativa de epimastigotes, amastigotes, y metacíclicos para las cepas mutantes reconstituidas y la salvaje, a través de observación al microscopio.





**Figura V.35.-Análisis del cambio de estadio en mutantes nulos transfectados.** Se analizó el porcentaje de amastigotes (A) y tripomastigotes (B) en el sobrenadante de mutantes nulos transfectados con pTEXble-LYT1 y pTEXble-LYT1 $\delta$ atg. Como controles se utilizaron parásitos salvajes y mutantes nulos transfectados sólo con el vector.

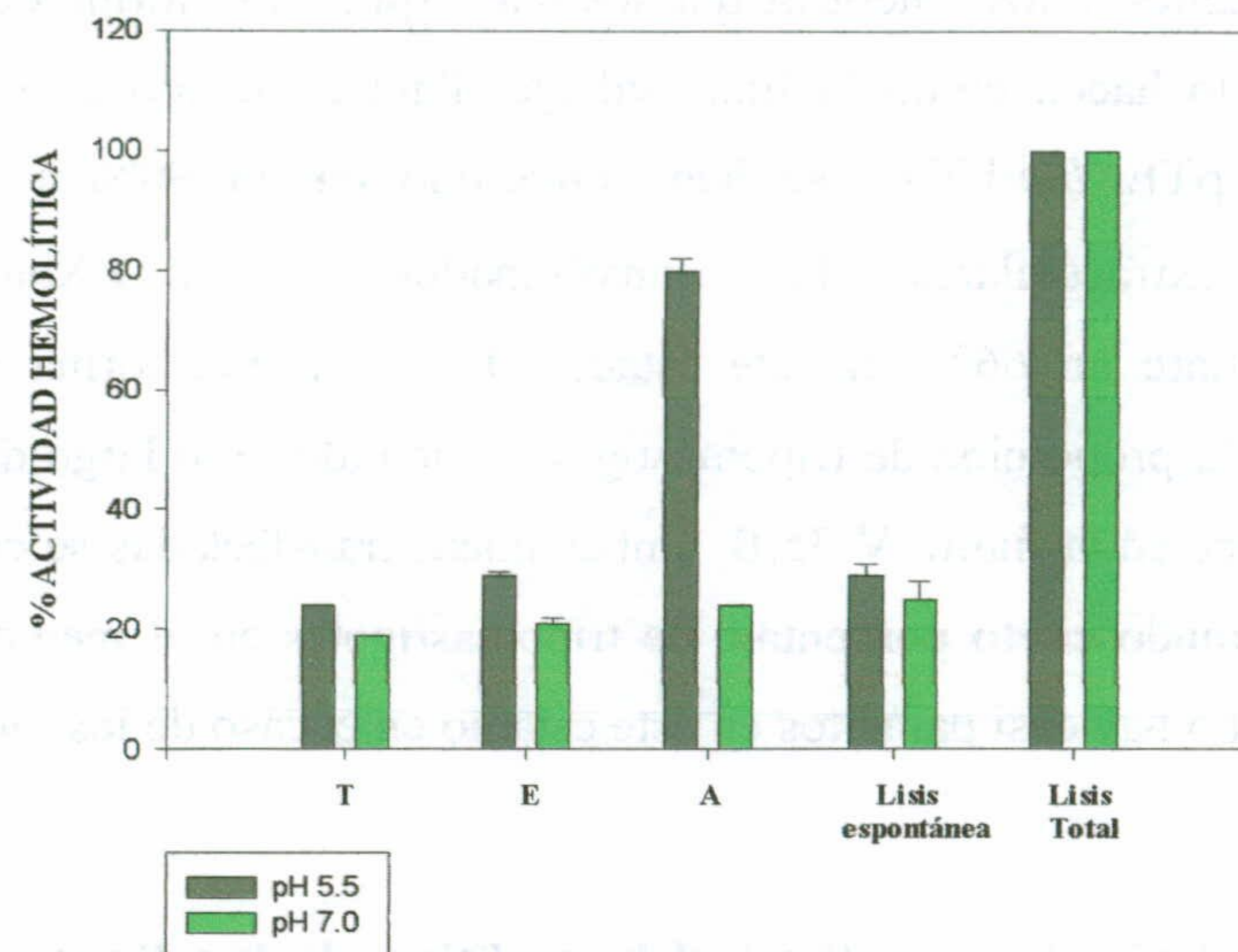




Los resultados presentados en la figura V 35A, muestran que, después de ser transferidos a DMEM, los parásitos que expresan la forma completa de la proteína se comportan como los parásitos mutantes nulos, mientras que los que expresan la forma de la proteína carente del primer ATG lo hacen como la línea salvaje. Para el tiempo en que los parásitos con la construcción pTEXble-LYT1 se han convertido en un 90% a parásitos semejantes a amastigotes extracelulares, los transformados con pTEXble-LYT1 $\delta$ atg presentan aproximadamente un 66% en este estadio. De la misma forma se pueden analizar los resultados de la proporción de tripomastigotes obtenidos a lo largo del tiempo. En este caso, y como aparece en la figura V 35.B, ambas líneas transfectadas se comportan como la línea salvaje, mostrando cierto porcentaje de tripomastigotes en el medio a lo largo del tiempo, mientras que no hay casi parásitos en este estadio en el caso de los mutantes nulos.

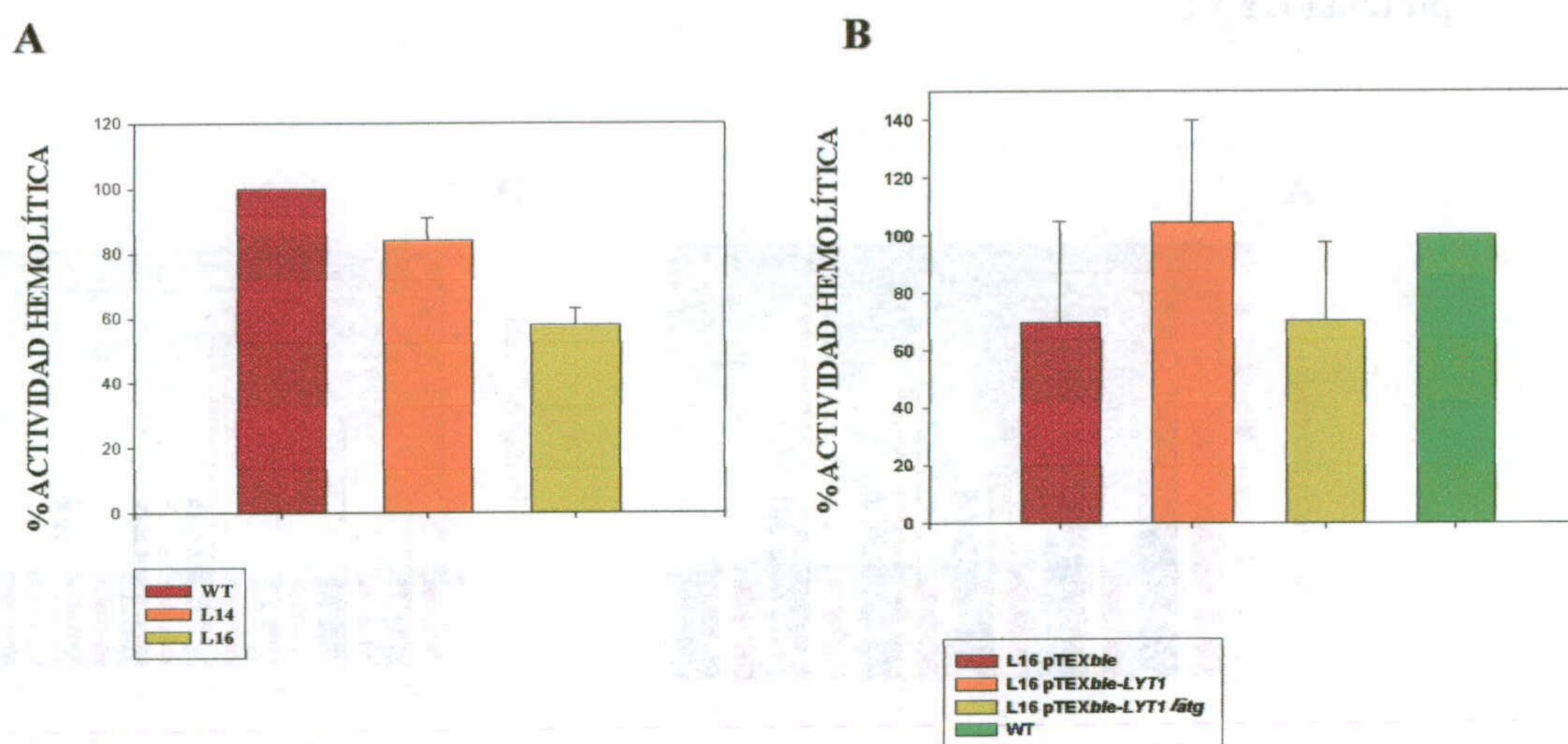
#### **V.5.3.3 Análisis de la actividad hemolítica de las líneas L16pTEXble-LYT1 y L16pTEXble-LYT1 $\delta$ atg**

La marcada reducción en la infección llevada a cabo por las líneas deficientes en LYT1 se pensó que podía ser debida a una disminución en la actividad lítica mediada por el parásito. Andrews y Whitlow en 1989 describieron que, tras una incubación de 3 horas de los distintos estadios de *T. cruzi* con eritrocitos de conejo tanto a pH neutro como ácido, los niveles de hemolisis a pH 7.0 eran similares en todos los casos pero que las formas amastigotas eran las que presentaban mayor actividad lítica a pH 5.5 (figura V 36).



**Figura V.35.-Actividad hemolítica de tripo-, epi-, y amastigotes de *T. cruzi* a pH 7.0 y pH 5.5..** Representación de la actividad hemolítica de los tres estadios del parásito a pH neutro o a pH ácido. Se indican el control de lisis espontánea y el control de lisis total.

De los tres estadios, las formas epimastigotas son las que presentan menor actividad hemolítica a pH ácido, pero esta actividad puede ser detectada incubando durante más tiempo los parásitos con los eritrocitos [Andrews y Whitlow., 1989]. Epimastigotes ( $2 \times 10^7$  parásitos) de la línea salvaje y mutantes nulos se incubaron con eritrocitos de conejos ( $2 \times 10^7$  células) en 0.5 ml del tampón ácido (descrito en materiales y métodos) durante 5 horas a 37°C. La actividad hemolítica de la línea salvaje y de los mutantes nulos se determinó para el tiempo en que la línea salvaje lisaba el 50% de los glóbulos rojos a pH 5.4 (que se define como el 100% de la actividad lítica). En la figura V 37A se observa que los mutantes nulos tienen menor actividad hemolítica que los parásitos salvajes: cuando se consideró que la línea salvaje había alcanzado el 100% de actividad lítica, L16 alcanzó un 58%. Cuando se realizó el mismo experimento con los parásitos transfectados se observó que los parásitos expresando LYT1 se comportaban como la cepa salvaje, llegando incluso a presentar algo más de actividad hemolítica (como puede corresponder a una situación de sobreexpresión de la proteína). Por otro lado, los parásitos expresando LYT1 $\delta$ atg, se comportaban como los mutantes nulos, mostrando menor actividad lítica que los anteriores.



**Figura V.37.-Actividad hemolítica de epimastigotes de *T. cruzi*.** (A) Representación de la actividad hemolítica de los parásitos salvajes y los mutantes nulos a pH ácido. (B) Comparación de la actividad hemolítica de los mutantes nulos expresando las formas alternativas de la proteína.

#### V.5.3.4 Análisis de la infectividad de los mutantes nulos transfectados

Para estudiar la posible asociación entre cada una de las posibles formas de la proteína LYT1 en el proceso infeccioso, se analizó lo que ocurría a lo largo del tiempo en el transcurso de una infección llevada a cabo con las líneas transfectadas y en comparación con los mutantes nulos y los parásitos salvajes.

Las infecciones fueron llevadas a cabo con tripomastigotes metacíclicos (a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  parásitos/ml) derivados de epimastigotes de la línea salvaje y de los mutantes nulos. Se purificaron por su resistencia al complemento humano (frente a la sensibilidad de los epimastigotes), y se añadieron a las células NRK en semiconfluencia crecidas en cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro. Cada experimento se hizo por duplicado. A las 2 horas de la infección, se lavaron todas las muestras con PBS<sup>++</sup>. A continuación se tomaron muestras a 2h, 4h, 6h y 24h, correspondientes a una invasión a corto plazo, y se dejó que la infección progresara tomando muestras a las 48h, 72h y 96h. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas en 2% de paraformaldehído en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación se realizó la triple tinción de las muestras (como se describe en el apartado V.4.1.2) para determinar los acontecimientos intracelulares



en el curso de las infecciones relacionados con la expresión de una u otra forma de la proteína LYT1.

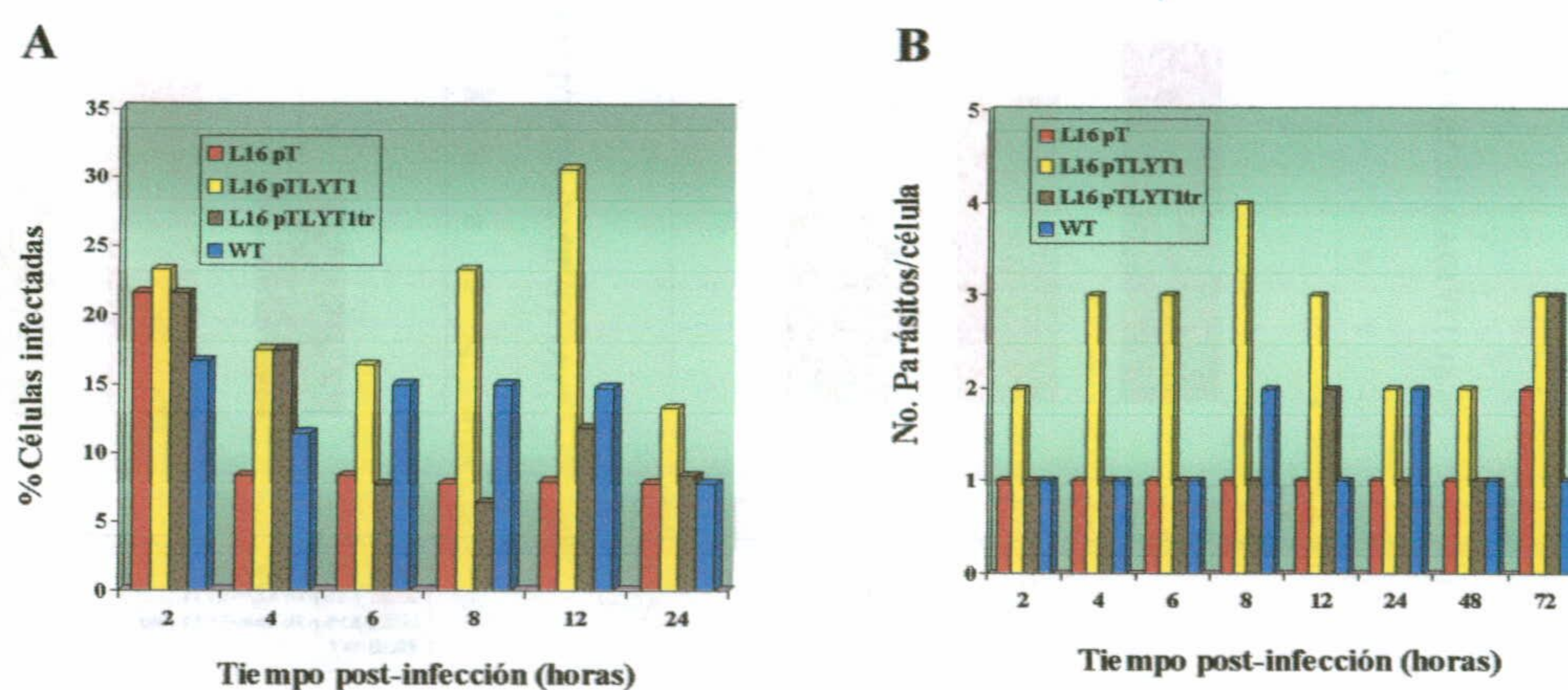
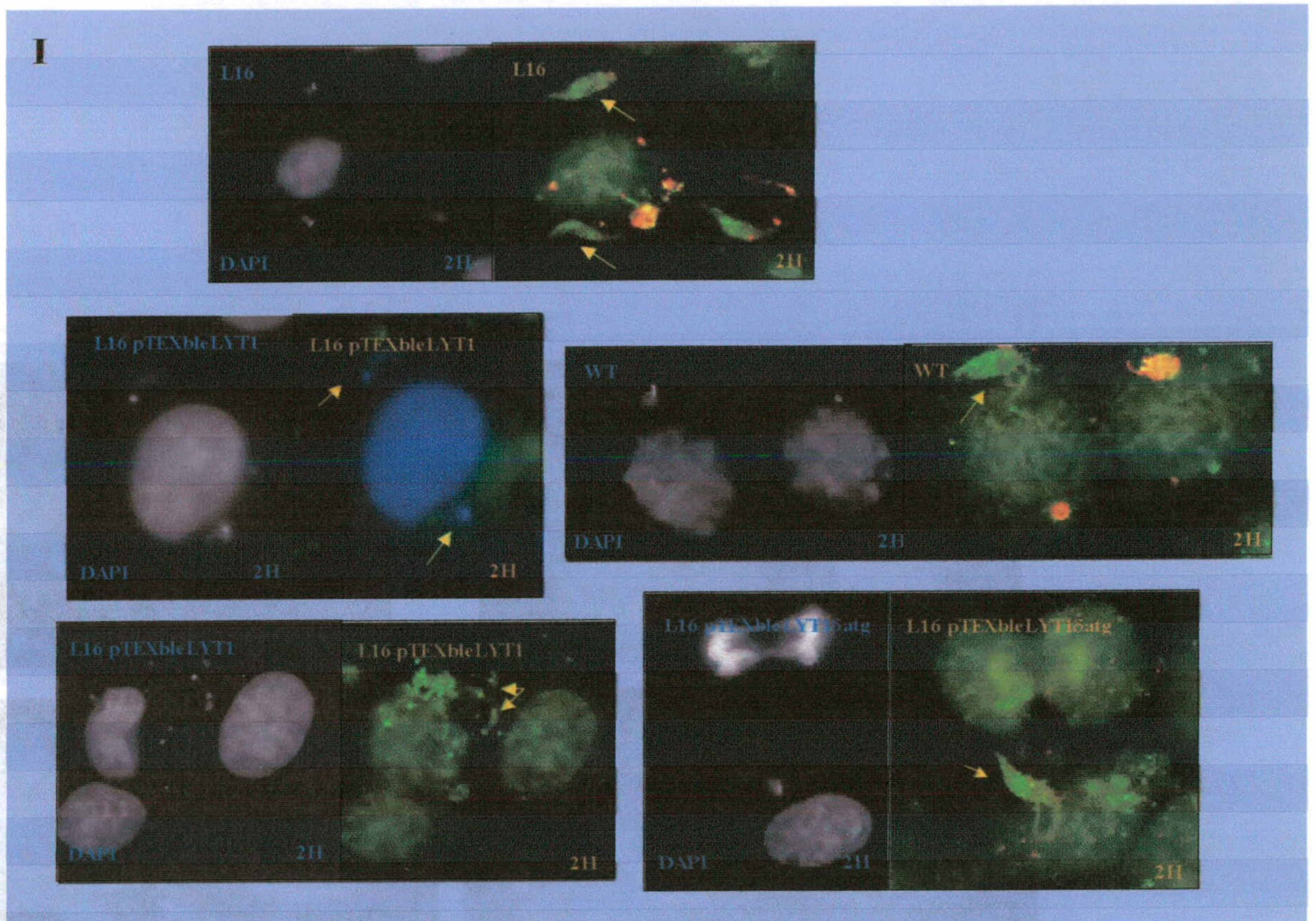


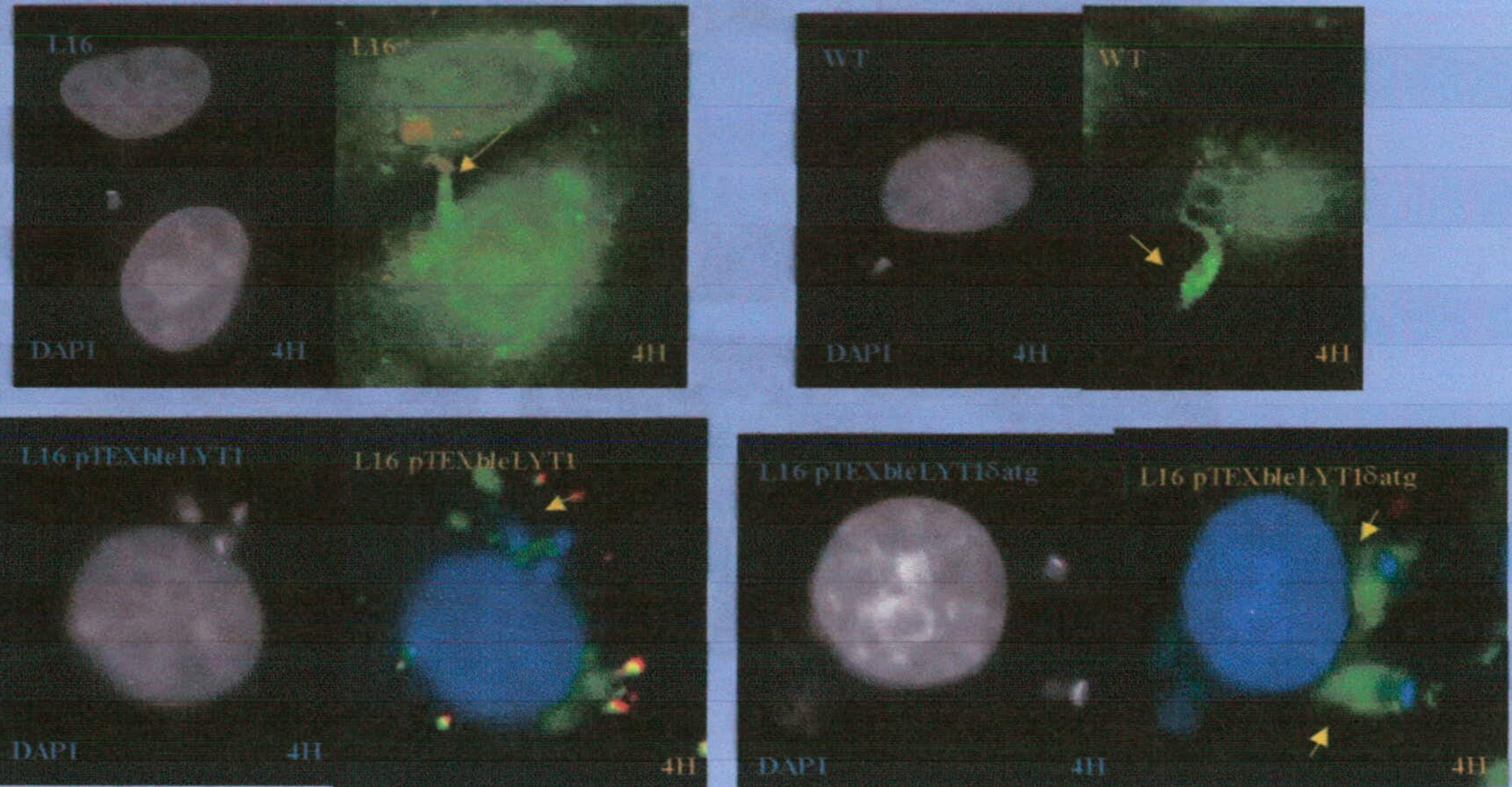
Figura V.38.-Representación gráfica del porcentaje de células infectadas y del número de parásitos por célula.

En el curso de este experimento se observó que en todos los casos la capacidad infectiva al principio era similar y que se encontraba, en general, algo disminuida (como se ha descrito para el caso de la utilización en procesos infectivos de parásitos transformados). Se observó que en el caso de los parásitos expresando LYT1 se encontraban parásitos en el citosol desde las etapas más tempranas de la infección (2 horas), aunque parecía que existía otra población (probablemente parásitos resistentes al antibiótico de alguna forma, pero que no expresan LYT1) que se comportaba como los mutantes nulos. De esta forma, se encontraban para cada tiempo de la infección temprana (esto es 2,4 y 6 horas) parásitos en vacuolas y en citosol. En el caso de los que expresan LYT1 $\delta$ atg, también parecía haber dos poblaciones, que, en este caso, aparecían fuera de las vacuolas más tarde en la infección, de igual forma que los mutantes nulos. A lo largo de la infección el número de células infectadas fue mayor en el caso de los parásitos expresando LYT1. Respecto al número de parásitos por célula, se observó que ambas líneas transformadas presentaban mayor número de parásitos por célula que los mutantes nulos, y este hecho se manifestó de una forma más patente en tiempos tardíos de la infección donde las líneas transfectadas presentaban gran número de parásitos por célula, siendo siempre mayor en el caso de las que expresaban LYT1.





## II





## V.6 EXPRESIÓN DE *LYT1* EN *Leishmania tropica*

Se expresó *LYT1* en promastigotes de *L. tropica*. Para ello la región codificante del gen fue clonada en el vector de expresión px63NEO.

### V.6.1 Construcción del sistema de expresión px63NEO-*LYT1*.

La región codificante del gen *LYT1* se amplificó con los cebadores Artx-8, que contiene el ATG iniciador e incorpora un sitio *Bam*HI, y Artx-1, correspondiente a la secuencia 799 nucleótidos corriente abajo del codón de terminación. Con estos dos cebadores y utilizando el clon pGEM5Zf(+)-*LYT1*-5.8 como molde y las siguientes condiciones de PCR: 1.5 minutos a 95°C, 2 minutos a 32°C, 2 minutos a 72°C durante 10 ciclos; 1.5 minutos a 95°C, 2 minutos a 46°C, 2 minutos a 72°C, se amplificó una banda de 2460 pares de bases. El DNA se purificó y se digirió con *Bam*HI. Tras purificar por *Gene clean* el producto de la digestión, se ligó al vector px63NEO digerido con *Bam*HI y desfosforilado (figura V 40).

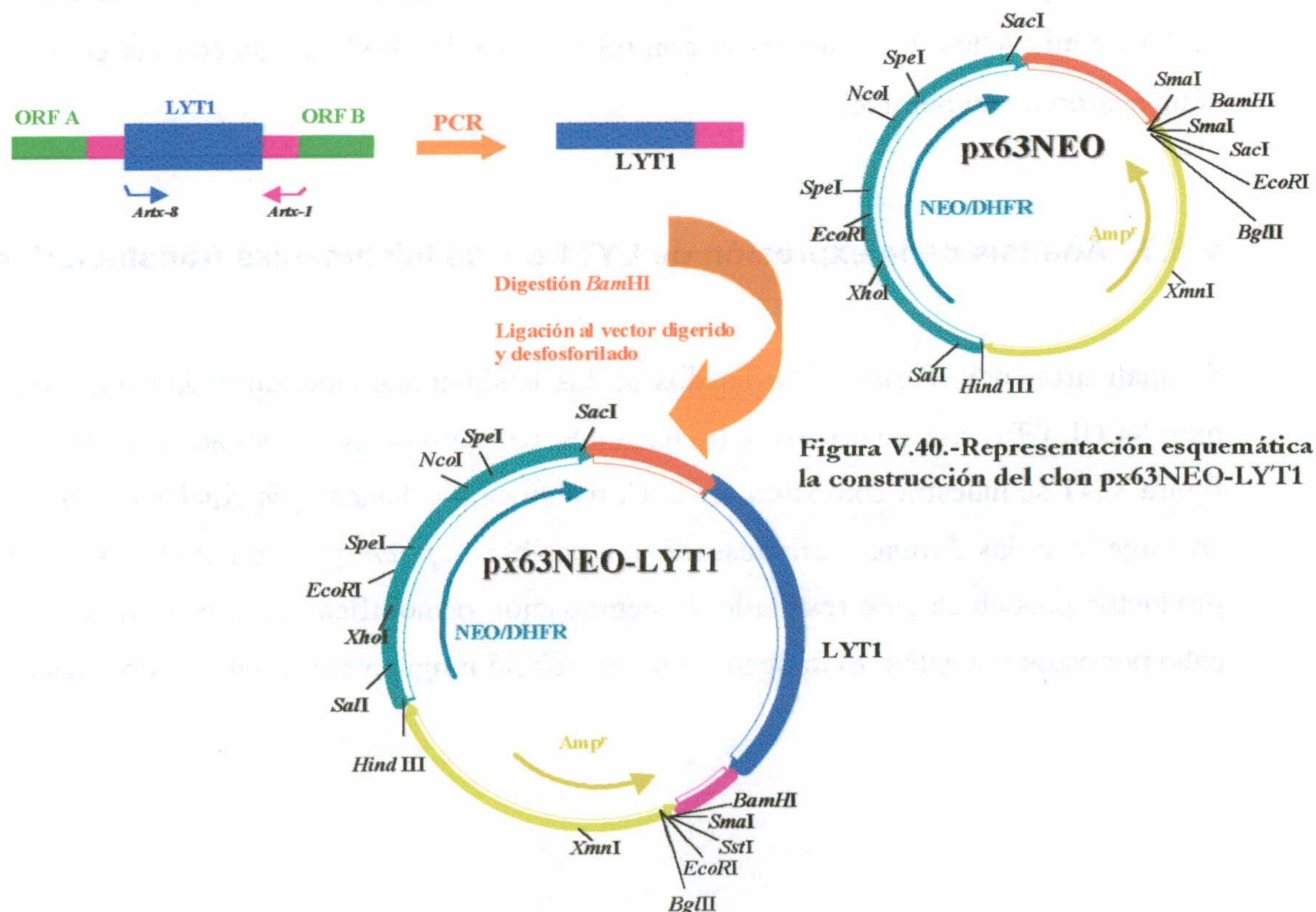


Figura V.40.-Representación esquemática de la construcción del clon px63NEO-*LYT1*





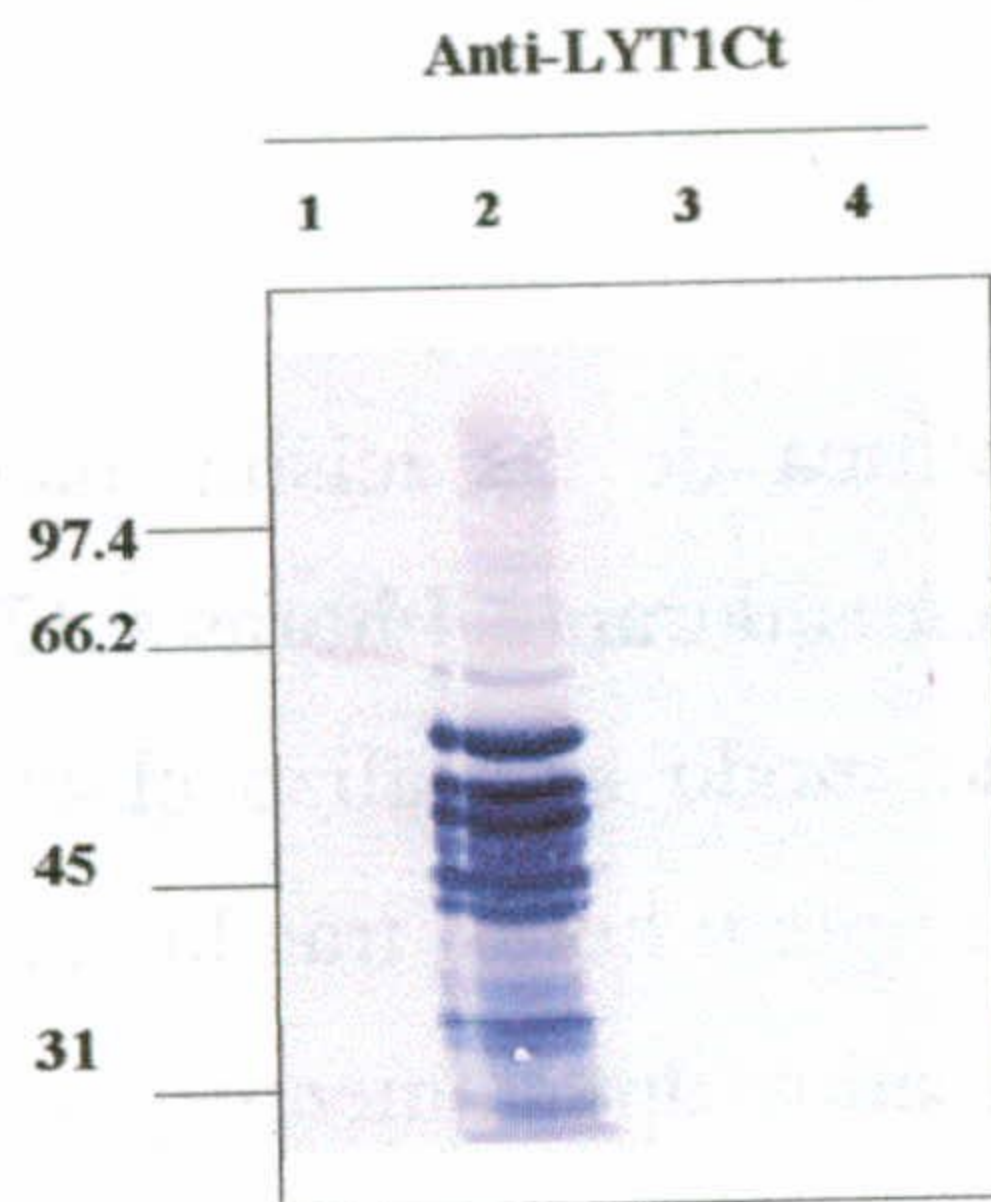
Se transformaron bacterias XLI-Blue y los clones resistentes se analizaron para comprobar la presencia del inserto (mediante digestión con *Bam*HI) y su orientación correcta (mediante secuenciación). Finalmente, se obtuvieron px63NEO y px63NEOLYT1 utilizando las columnas del kit *PerfectPrepPlasmid Maxi* de *Promega*.

### V.6.2 Transfección de *L. tropica* con el gen *LYT1*.

Se lavaron en frío  $2 \times 10^8$  parásitos y se resuspendieron en 2 ml de tampón HBS (concentración final  $10^8$  parásitos/ml). En cubetas de electroporación se mezclaron 0.4 ml de parásitos con 0.1 ml de DNA (1 mg/ml) y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Se electroporaron leishmanias con px63NEO, con px63NEOLYT1, y con TE como control de transfección. Las condiciones de electroporación fueron 500 V de resistencia/capacitancia, 450 V de carga, R1 igual a 13 ohm, y 800  $\mu$ F. Las leishmanias electroporadas se adicionaron a 10 ml de medio 199 con 10% de SBFi sin antibiótico. En estas condiciones se incubaron durante 24 horas a 28°C sin agitación, tras lo cual se añadió G-418 a una concentración final de 20  $\mu$ g/ml. A las dos semanas el control murió y las leishmanias con las construcciones comenzaron a recuperarse.

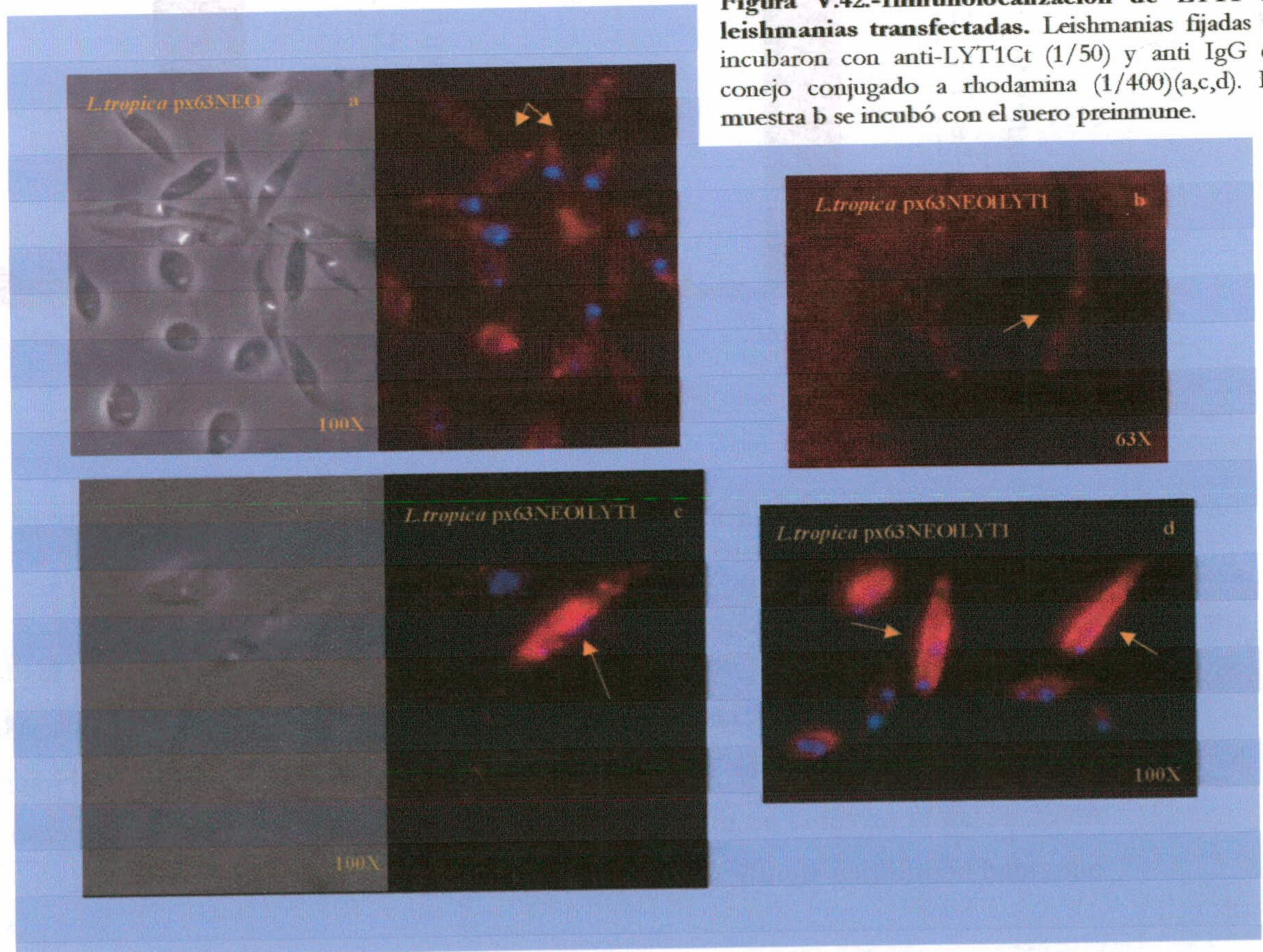
### V.6.3 Análisis de la expresión de *LYT1* en las leishmanias transfectadas.

Se analizaron por *Western blot* lisados de las leishmanias electroporadas con px63NEO y px63NEOLYT1, así como los sobrenadantes respectivos condicionados a pH 5.5. En la figura V.41 se muestra como anti *LYT1*Ct reconoce dos bandas principales correspondientes en tamaño a las formas derivadas de un posible “*splicing*” alternativo, así como otros productos probablemente resultado de degradación o modificaciones específicas llevadas a cabo por estos parásitos. El anticuerpo no reconoció ninguna banda en los sobre nadantes.



**Figura V.41.-Inmunodetección de LYT1 en leishmanias transfectadas.** Carril 1, lisado de *L.tropica* transfectada con px63NEO; carril 2, lisado de *L.tropica* transfectada con px63NEOLYT1; carril 3, sobrenadante condicionado a pH ácido de *L.tropica* transfectada con px63NEO; carril 4, sobrenadante condicionado a pH ácido de *L.tropica* transfectada con px63NEOLYT1.

La localización de la proteína se llevó a cabo a través de una inmunofluorescencia indirecta (realizada tal y como se describe en materiales y métodos apartado V.2.3.9), revelándose su presencia en la membrana de las leishmanias transfectadas con px63NEOLYT1, tal y como se muestra en la figura V.42.



**Figura V.42.-Inmunolocalización de LYT1 en leishmanias transfectadas.** Leishmanias fijadas se incubaron con anti-LYT1Ct (1/50) y anti IgG de conejo conjugado a rodamina (1/400)(a,c,d). La muestra b se incubó con el suero preinmune.



#### V.6.4 Análisis de la actividad hemolítica.

Se llevó a cabo el estudio de la actividad hemolítica de las leishmanias transfectadas incubando extractos totales de las mismas con eritrocitos durante 4 horas a 37°C, tanto en un tampón a pH ácido como a pH neutro. Del mismo modo se realizó el experimento con sobrenadantes condicionados a pH neutro y ácido durante 6 horas, tras lo cual se recogieron los sobrenadantes y se concentraron, para ser incubados directamente y en los tampones adecuados con los eritrocitos durante 4 horas a 37°C. Los resultados se normalizaron teniendo en cuenta los valores de lisis espontánea y lisis total en cada caso.

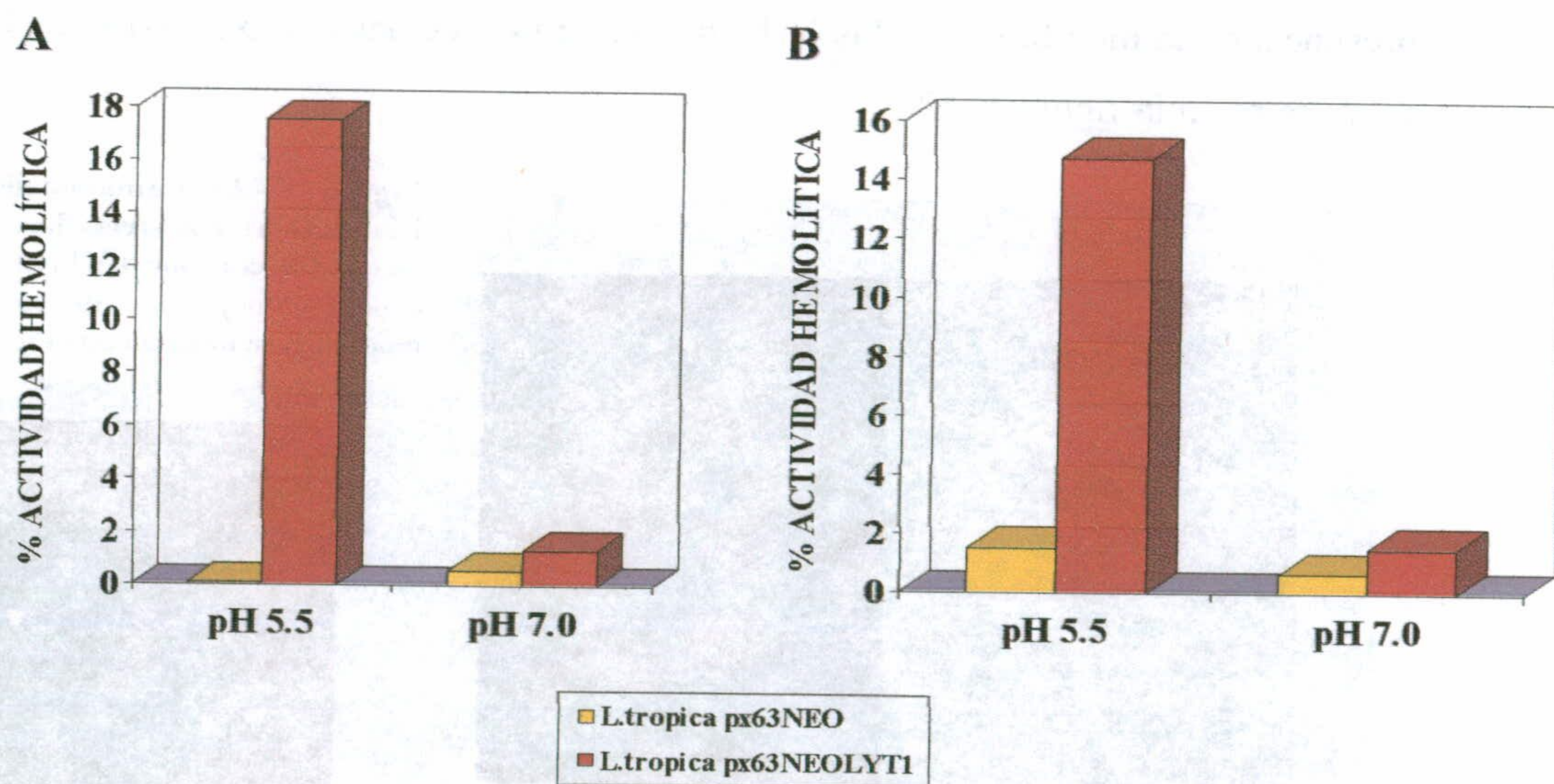


Figura V.43.-Actividad hemolítica de extractos (A) y sobrenadantes condicionados (B) de leishmanias transfectadas con px63NEO-LYT1.

En la figura V.43 se observa la diferencia respecto a actividad hemolítica en las leishmanias transfectadas con LYT1 y las transfectadas con el vector en los dos tampones. Mientras que las leishmanias expresando LYT1 presentan cierta actividad hemolítica a pH ácido, las que no expresan la proteína no tienen actividad hemolítica detectable. En ningún caso se observó actividad hemolítica significativa a pH neutro.



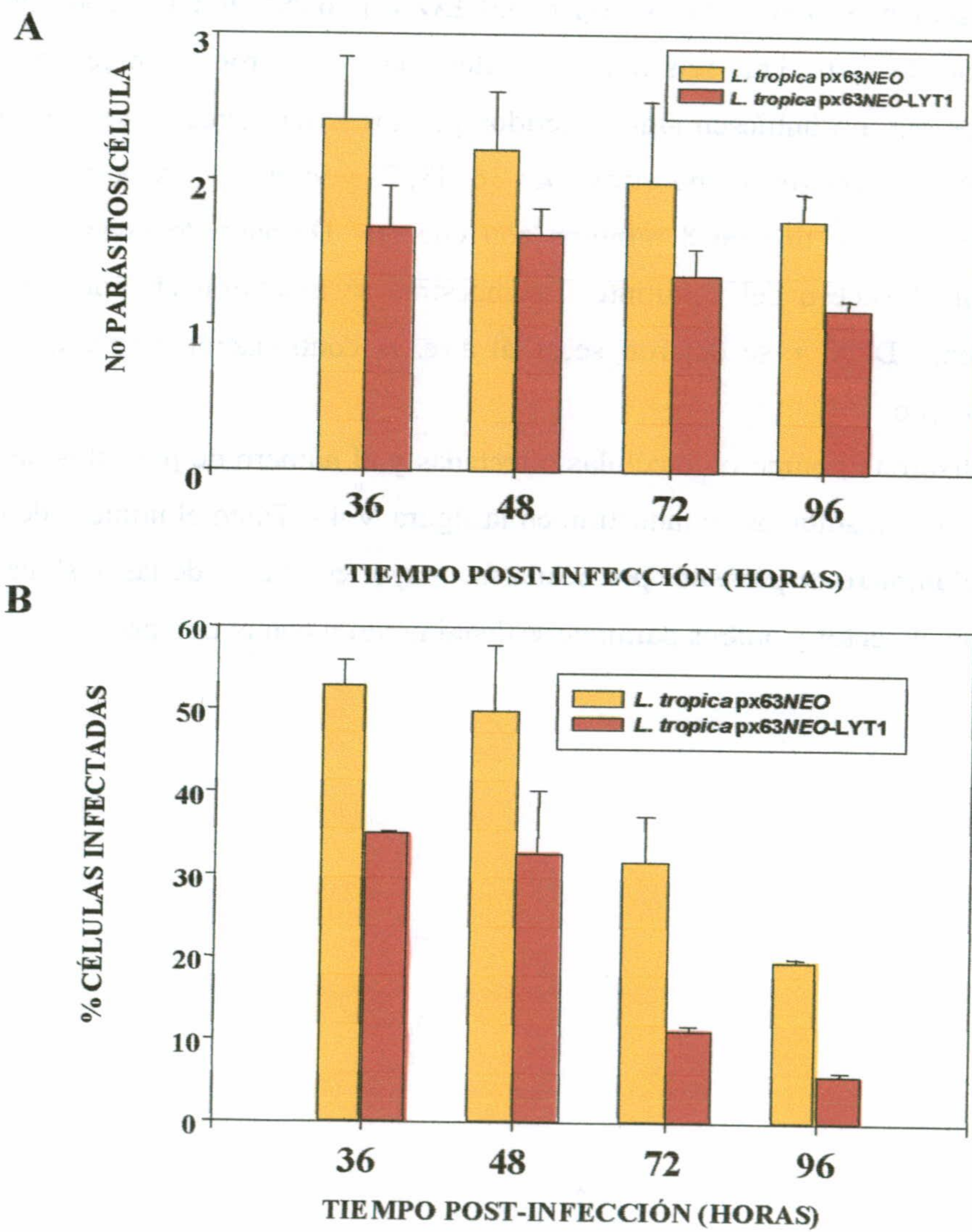
### V.6.5 Análisis de la infectividad de las leishmanias transfectadas.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se realizó un experimento de infección sobre macrófagos de la línea J774, para observar el efecto de la expresión de *LYT1* en el transcurso de un proceso infectivo. Macrófagos en estado semiconfluyente fueron infectados con leishmanias transfectadas con px63NEO y px63NEOLYT1, con una multiplicidad de infección de 1:20. Tras seis horas de infección, se lavaron las muestras para eliminar los parásitos que no hubiesen sido ingeridos por los macrófagos, y se dejó que progresara la infección. Se recogieron muestras a las 36, 48, 72 y 96 horas, tras lo cual se fijaron 1 minuto en metanol y se tiñeron 8 minutos con Giemsa. Después de lavar abundantemente para eliminar el exceso del colorante, las muestras se montaron en portaobjetos utilizando el pegamento DPX, y se dejaron secar al aire. A continuación se realizó la observación al microscopio.

Se analizaron el número de células infectadas y el número de parásitos por célula para cada tiempo. Los resultados se muestran en la figura V.44. Tanto el número de células infectadas como el número de parásitos por célula fue mayor en el caso de las leishmanias transfectadas sólo con el vector y ambos parámetros disminuyeron con el tiempo.



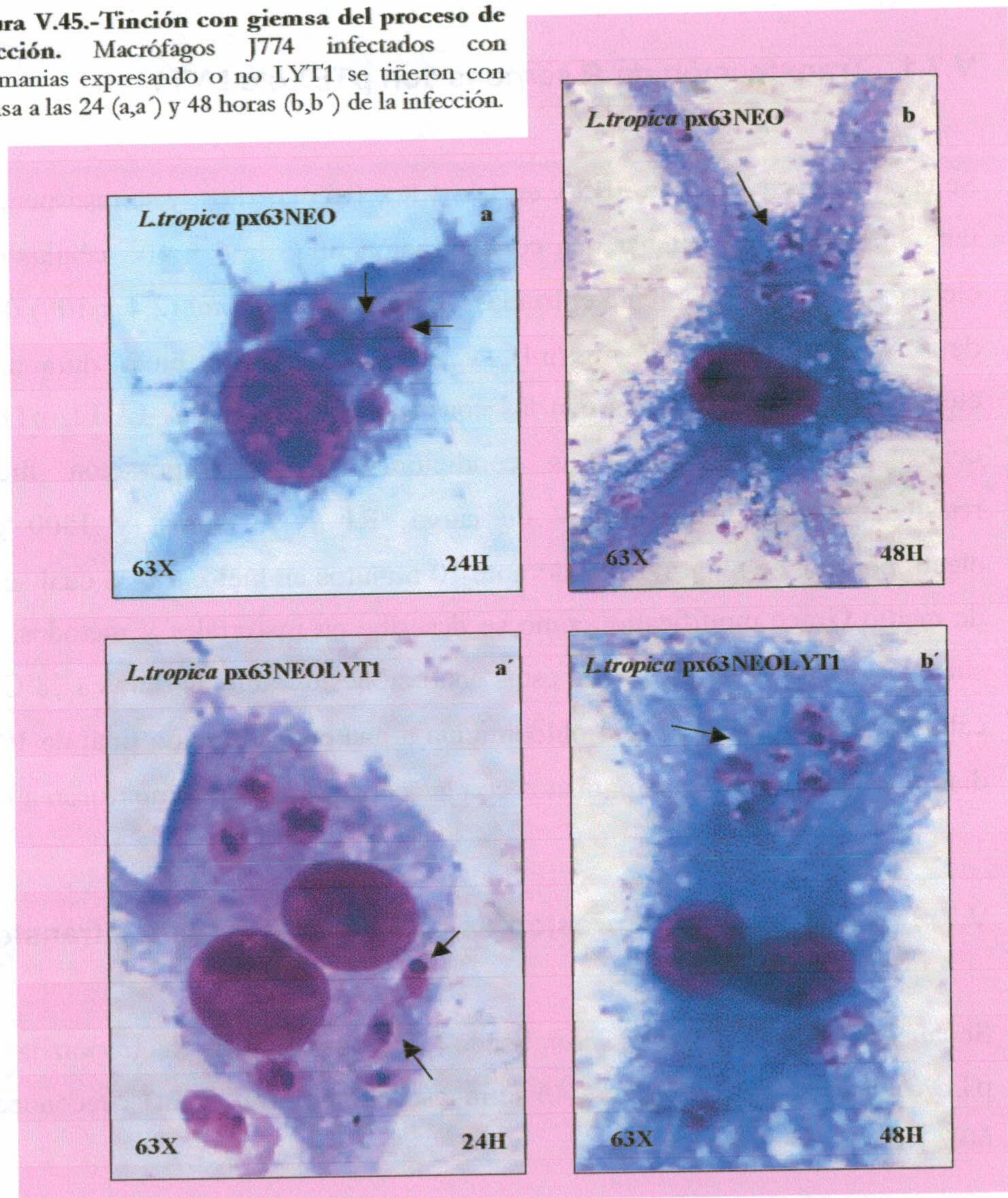
Figura V.43.-Progreso en la infección realizada con leishmanias transfectadas con px63NEO y px63NEO-LYT1. Después de 6 horas, se lavaron las muestras y se estimó el porcentaje de células infectadas (A) y el número de parásitos por célula (B) en diferentes tiempos (36, 48, 72, y 96 horas).





La principal diferencia entre ambas líneas se observó a las 24 horas de la infección en que la línea transfectada sólo con el vector mostraba amastigotes en división dentro de la vacuola, mientras que la línea expresando *LYT1* mostraba principalmente formas promastigotes, que parecían estar en el citosol (figura V.45).

**Figura V.45.-Tinción con giemsa del proceso de infección.** Macrófagos J774 infectados con leishmanias expresando o no *LYT1* se tiñeron con giemsa a las 24 (a,a') y 48 horas (b,b') de la infección.





## **V.7 EXPRESIÓN DE LYT1 EN *Phytomonas***

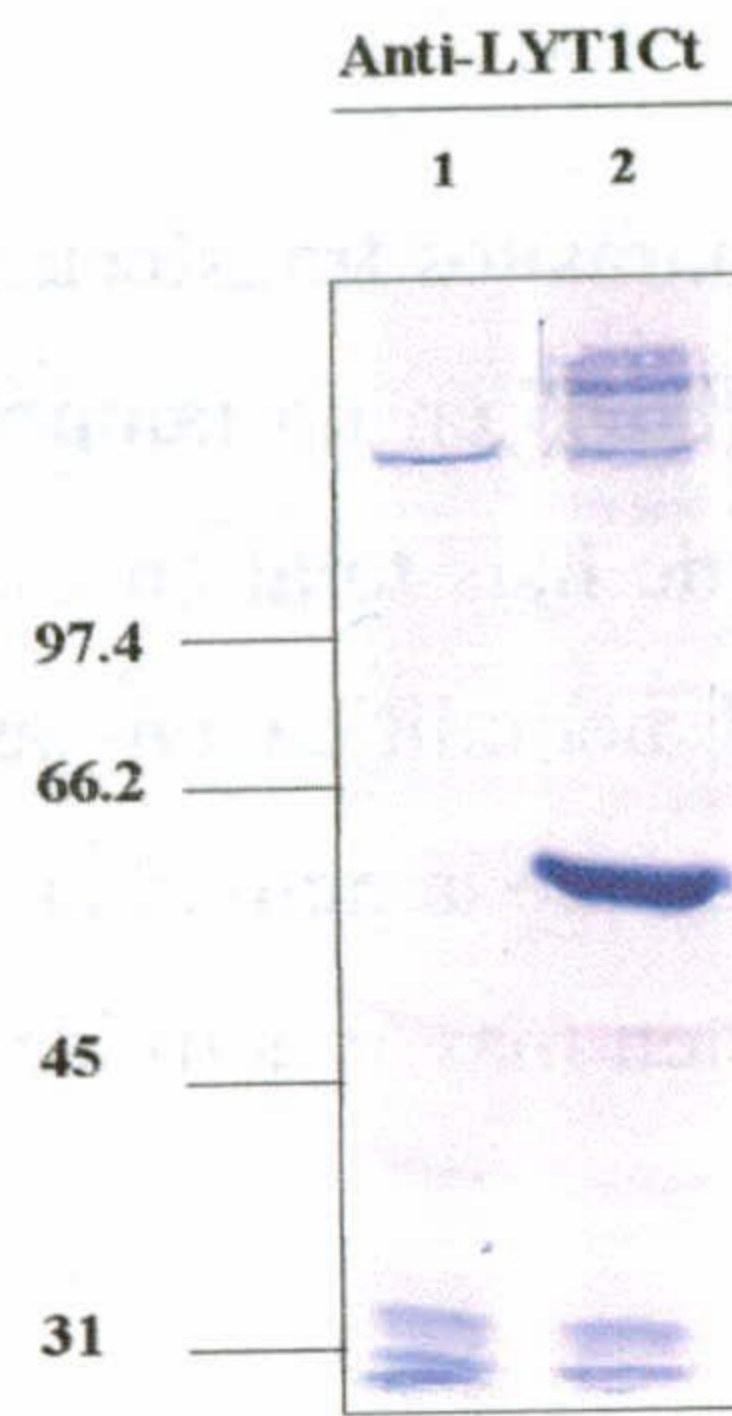
Se expresó LYT1 en parásitos de la especie *Phytomonas*. Para ello la región codificante del gen fue clonada en el vector de expresión pTEXble como se comentó en el apartado V.5.1 de esta misma sección de resultados.

### **V.7.1 Transfección de *P.serpens* con pTEXble-LYT1**

Se lavaron tres veces con PBS y en frío  $4.8 \times 10^8$  parásitos, y se resuspendieron en 0.8 ml de tampón HBS (para obtener una concentración final de  $6 \times 10^8$  células/ml). En cubetas de electroporación previamente enfriadas, se mezclaron 0.4 ml ( $2.4 \times 10^8$ ) de células con 50  $\mu$ l de DNA plasmídico (2 mgr/ml), y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Se electroporaron los parásitos con las construcciones pTEXble-LYT1, pTEXble, y TE como control de transfección. Las condiciones de electroporación fueron 500 V de resistencia/capacitancia, 360 V de carga,  $R1 = 13$  ohms, y 1500  $\mu$ F. Los parásitos electroporados se mantuvieron durante 10 minutos en hielo, tras lo cual se añadieron a 10 ml de medio Grace modificado, como se describe en materiales y métodos, con 10% de SBFi sin antibiótico. Se incubaron en estas condiciones durante 24 horas a 28°C sin agitación, y al cabo de ese tiempo se añadió phleomicina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml. A los 25 días el control murió y los parásitos con las construcciones comenzaron a recuperarse.

### **V.7.2 Análisis de la expresión de LYT1 en los parásitos transfectados.**

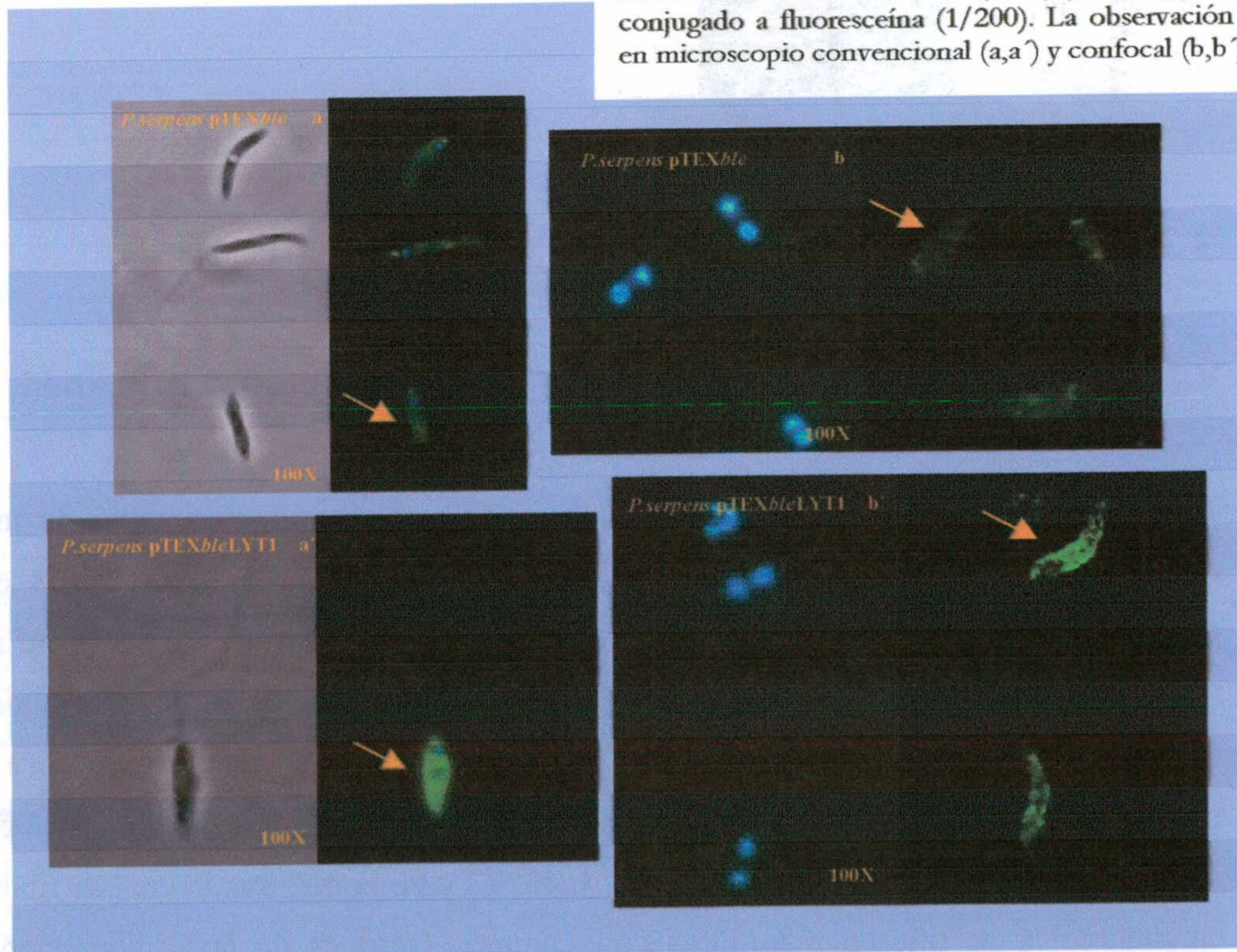
Se analizaron por *Western blot* lisados de *Phytomonas* electroporadas con pTEXble y pTEXbleLYT1. En la figura V.46 se muestra como anti LYT1Ct reconoce sólo la banda de 60.2 Kda.



**Figura V.46.- Inmunodetección de LYT1 en phytomonas transfectadas.** Carril 1, lisado de *P.serpens* transfectada con pTEXble, carril 2, lisado de *P.serpens* transfectada con pTEXble-LYT1;

La localización de la proteína se llevó a cabo a través de una inmunofluorescencia indirecta, revelándose su presencia en la membrana de los parásitos transfectados con. pTEXbleLYT1, tal y como aparece en la figura V.47.

**Figura V.47.-Inmunolocalización de LYT1 en phytomonas transfectadas.** Phytomonas fijadas se incubaron con anti-LYT1Ct (1/50) y anti IgG de conejo conjugado a fluoresceína (1/200). La observación se hizo en microscopio convencional (a,a') y confocal (b,b').







### V.7.3 Análisis de la actividad hemolítica.

Se llevó a cabo el estudio de la actividad hemolítica de los parásitos transfectados incubando éstos directamente con eritrocitos durante 4 horas a 37°C, tanto en un tampón a pH ácido. Los resultados se normalizaron teniendo en cuenta el valor de lisis total en cada caso. En la figura V.48 se observa la diferencia respecto a actividad hemolítica en las *phytomonas* transfectadas con LYT1 y las transfectadas con el vector. Aunque la actividad hemolítica fue baja en los dos casos, las *phytomonas* expresando LYT1 tienen mayor actividad hemolítica a pH ácido, que las que no expresan la proteína.

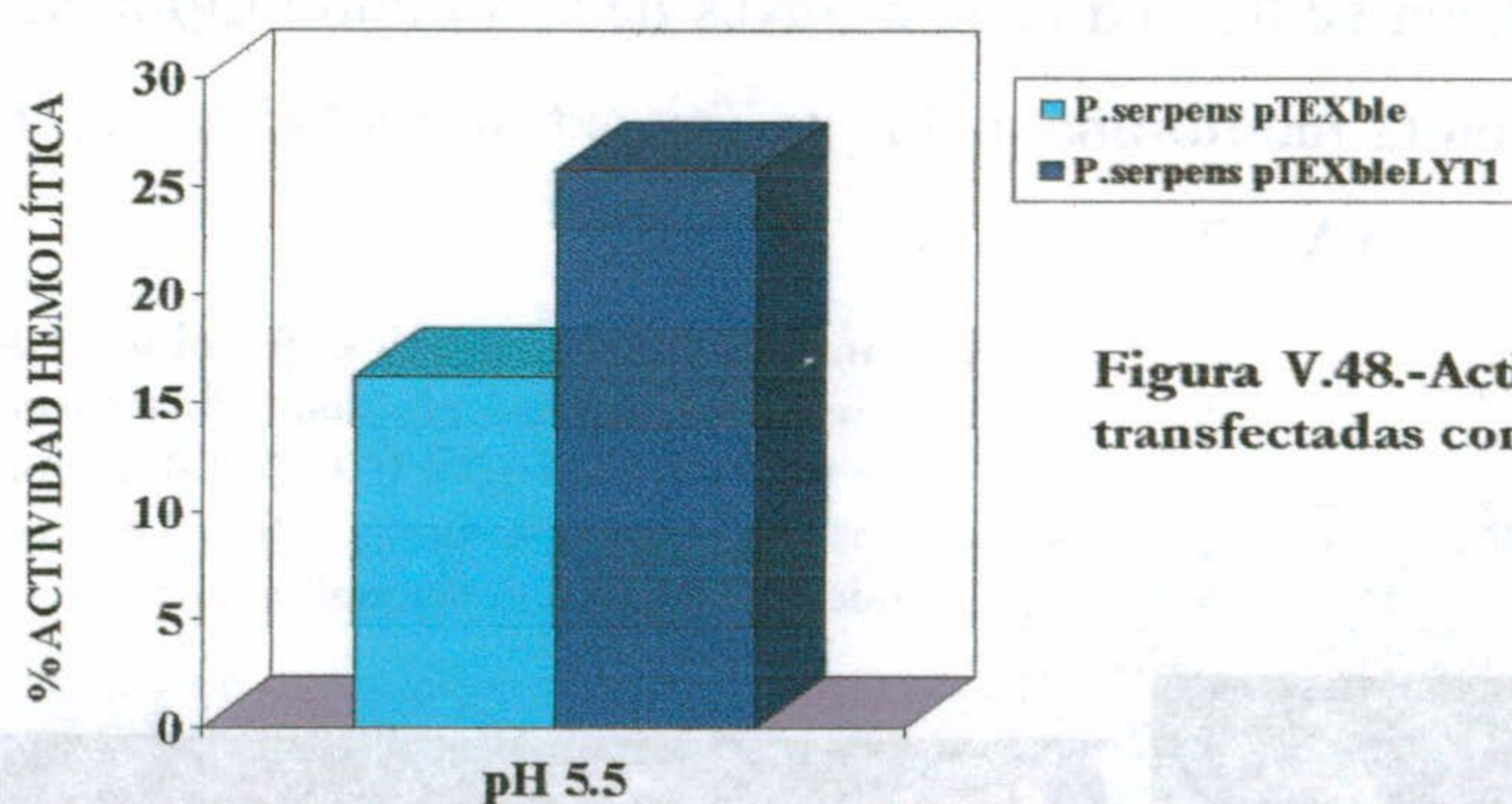


Figura V.48.-Actividad hemolítica de *phytomonas* transfectadas con pTEXble y pTEXble-LYT1.

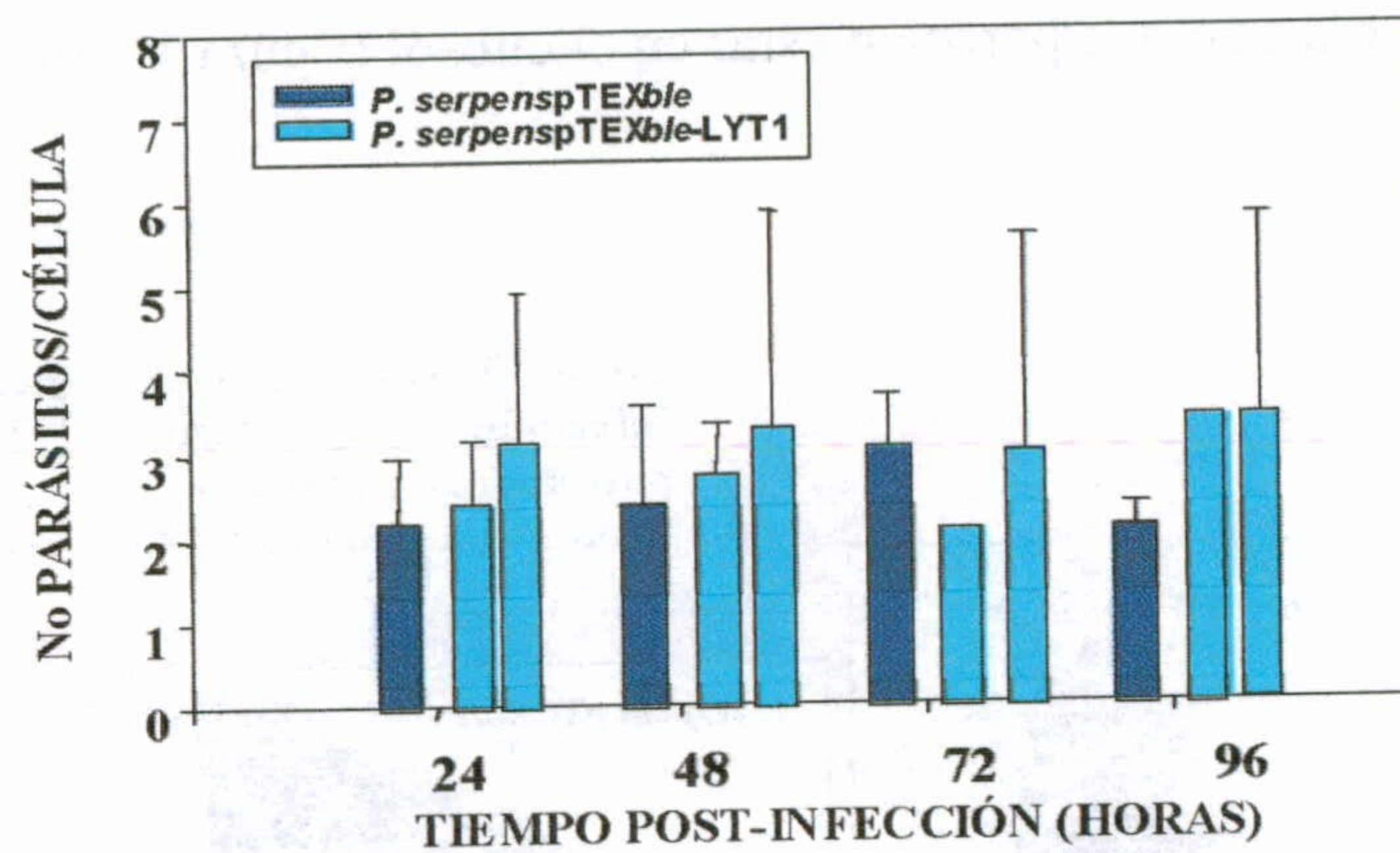
### V.7.4 Ensayo de infección con *P.serpens* expresando la proteína LYT1.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se realizó un experimento de infección con *P.serpens* sobre macrófagos de la línea J774, para observar el efecto de la expresión de LYT1 en el transcurso de un proceso infeccioso. Macrófagos en estado semiconfluyente fueron infectados con parásitos transfectados con pTEXble y pTEXbleLYT1, con una multiplicidad de infección de 1:20. Tras seis horas de infección, se lavaron las muestras para eliminar los parásitos que no hubiesen sido ingeridos por los macrófagos, y se dejó que progresara la infección. Se recogieron muestras a las 24, 48, 72 y 96 horas, tras lo cual se fijaron 1 minuto en metanol y se tiñeron 8 minutos con Giemsa. Después de lavar abundantemente para eliminar el exceso del colorante, las muestras se montaron en portaobjetos utilizando el



pegamento DPX, y se dejaron secar al aire. A continuación se realizó la observación al microscopio. Se analizaron el número de células infectadas y el número de parásitos por célula para cada tiempo. Los resultados se muestran en la figura V.49.

A



B

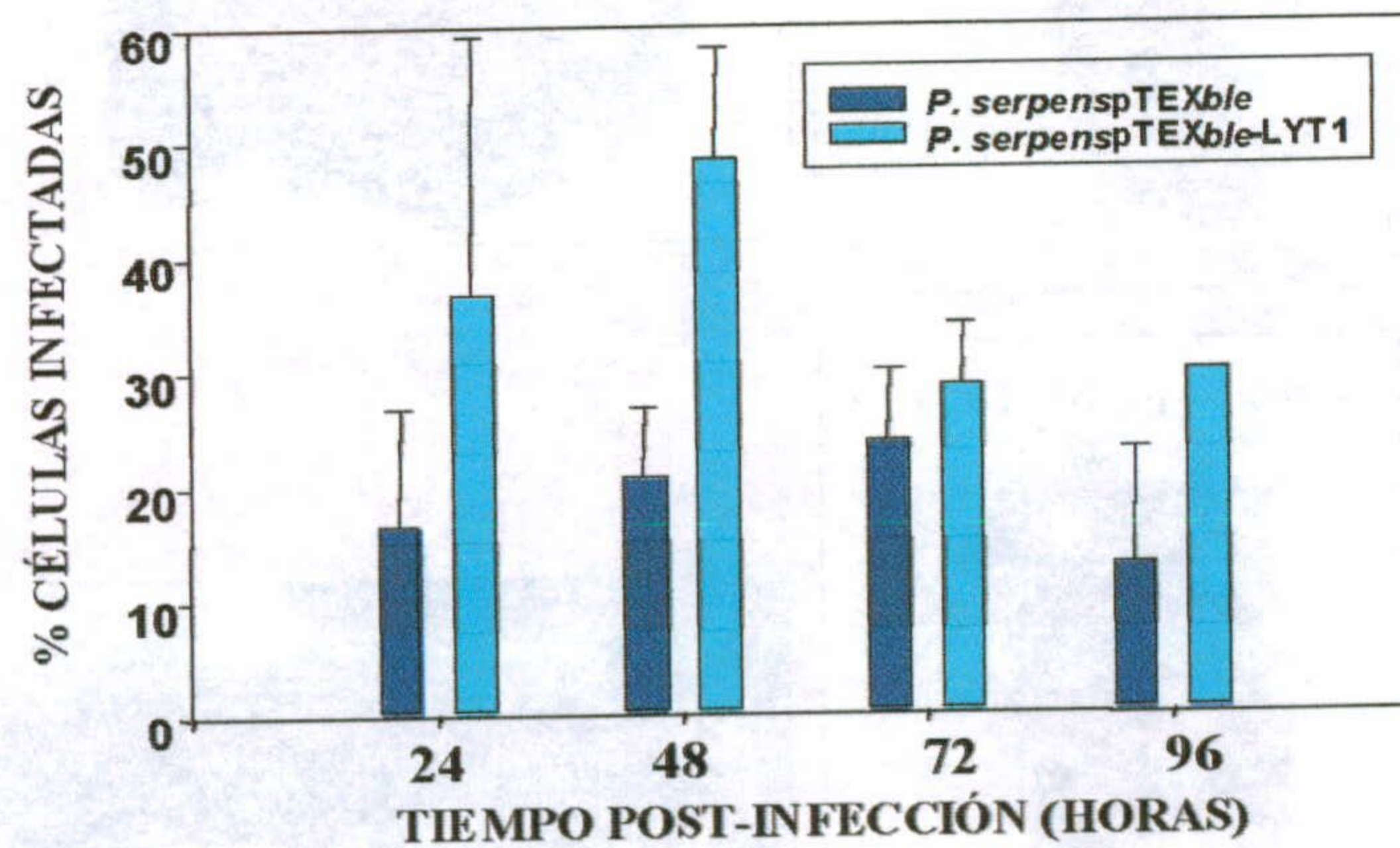
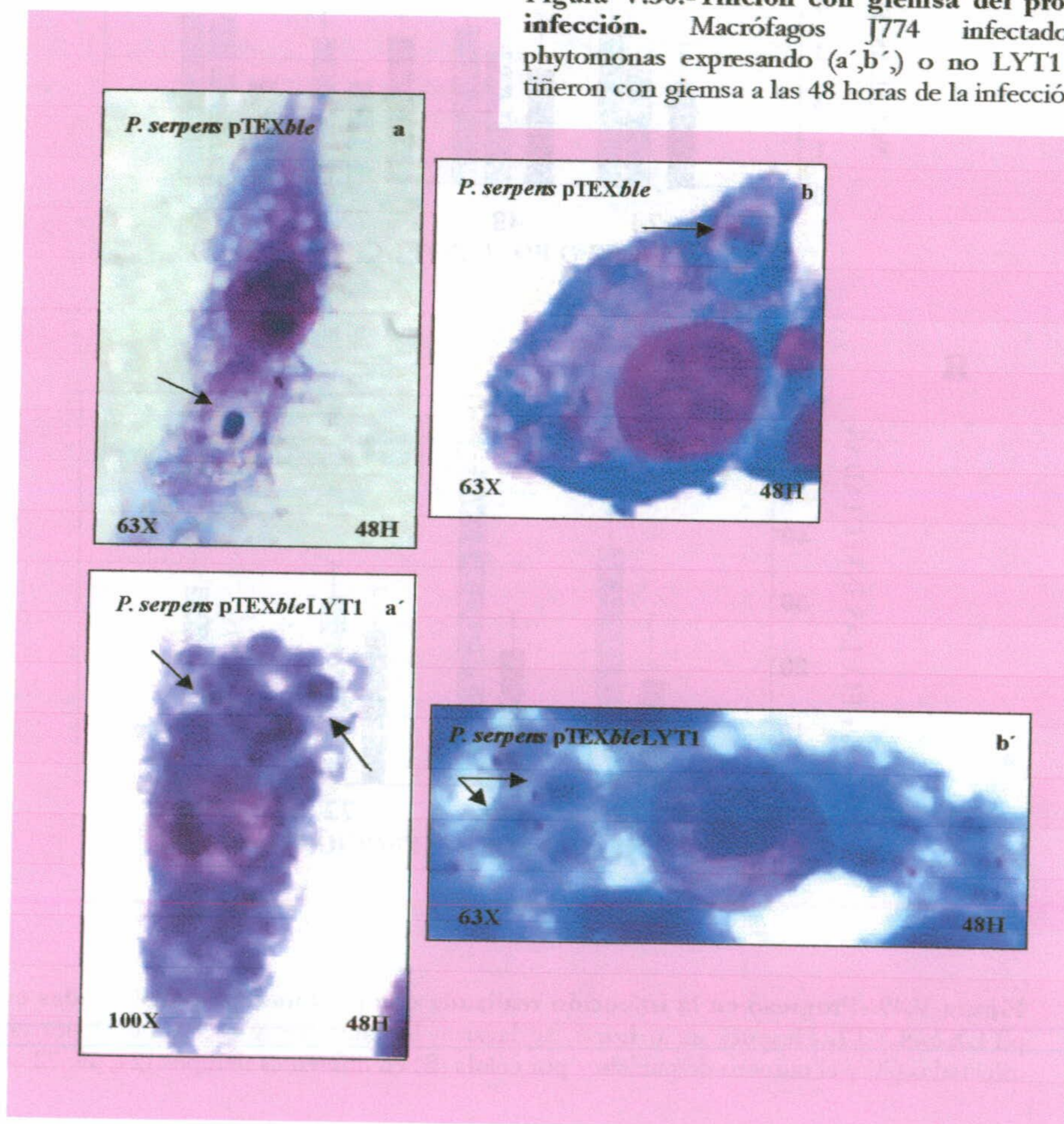


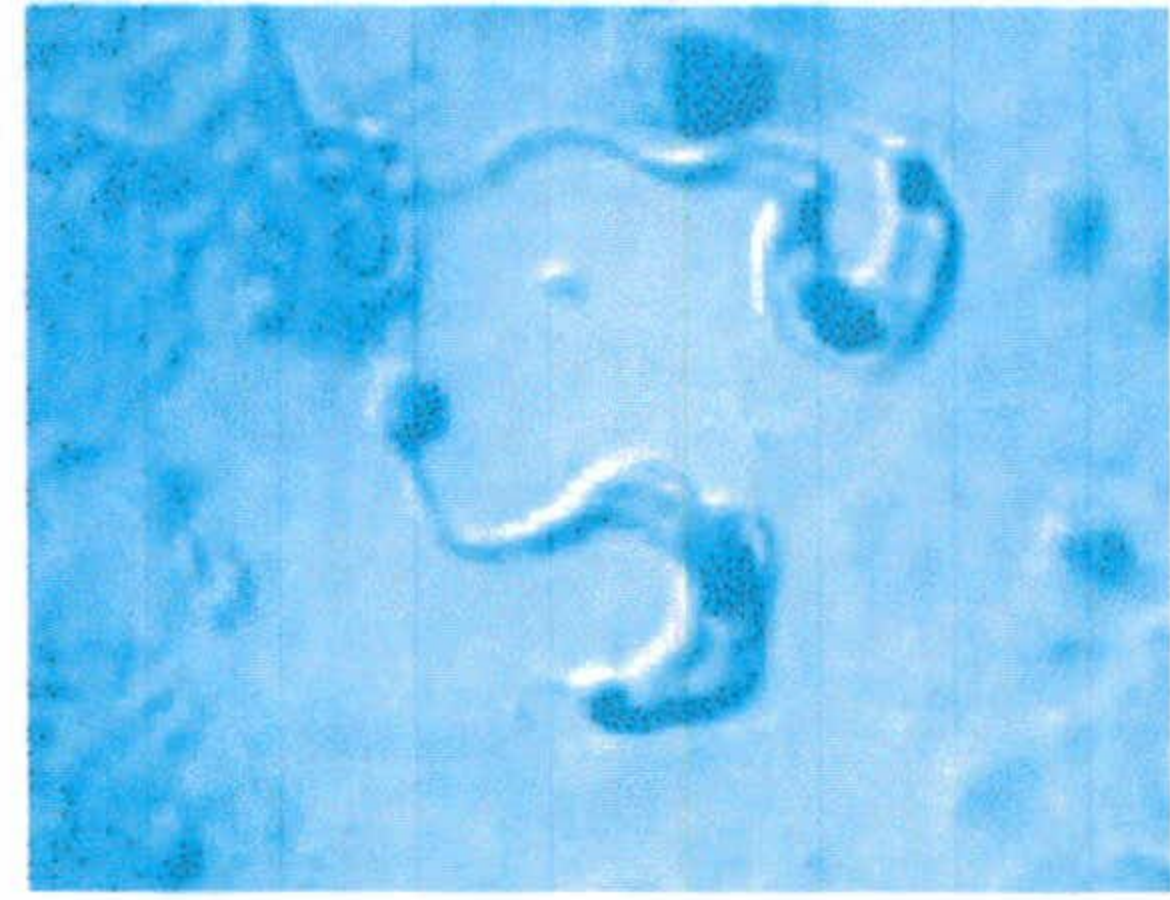
Figura V.49.-Progreso en la infección realizada con *phytomonas* transfectadas con pTEXble y pTEXbleLYT1. Después de 6 horas, se lavaron las muestras y se estimó el porcentaje de células infectadas (A) y el número de parásitos por célula (B) en diferentes tiempos (24, 48, 72, y 96 horas).



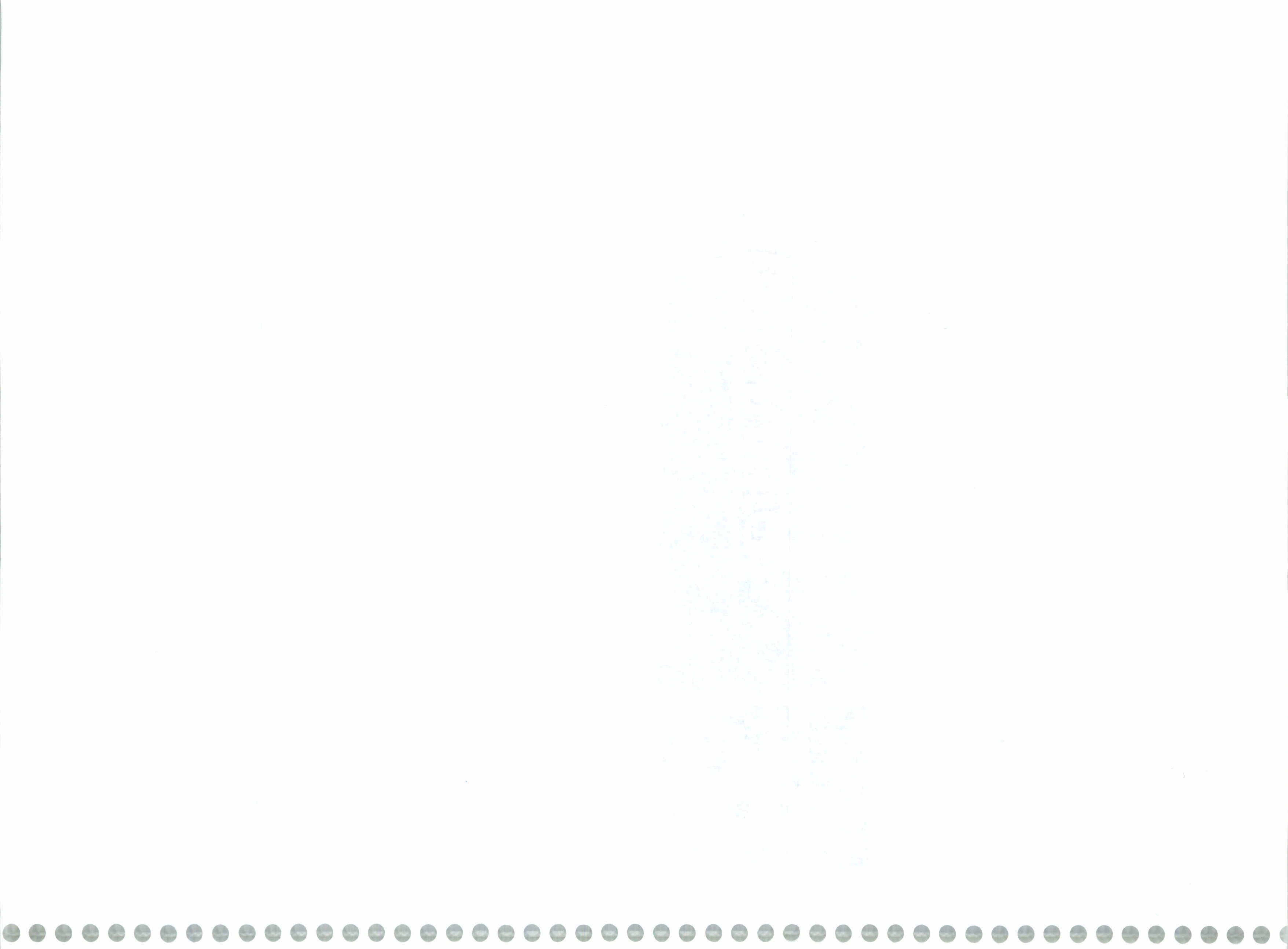
Tanto el número de células infectadas como el número de parásitos por célula fue mayor en el caso de las *phytomonas* expresando LYT1 y ambos parámetros disminuyeron con el tiempo. La principal diferencia entre ambas líneas se observó a las 48 horas de la infección en que la línea transfectada sólo con el vector mostraba parásitos en el interior de la vacuola formada en el proceso de infección por el macrófago y el número de parásitos por célula era muy bajo, mientras que la línea expresando LYT1 mostraba gran cantidad de parásitos en el interior del macrófago que parecían estar en el citosol (figura V.50)

**Figura V.50.-Tinción con giemsa del proceso de infección.** Macrófagos J774 infectados con *phytomonas* expresando (a',b') o no LYT1 (a,b) se tiñeron con giemsa a las 48 horas de la infección.





# Discusión





## VI DISCUSIÓN

### VI.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE LOS ALELOS a Y b DEL GEN *LYT1*

La secuencia codificante del gen *LYT1* se clonó en el vector pGEM5Zf(+)<sub>5.8</sub> obteniéndose el clon pGEM5Zf(+)*LYT1*<sub>5.8</sub> en el que se incluyen además otras dos zonas codificantes (ORF A y ORF B), que se encuentran incompletas.

Cuando se alineó la secuencia parcial del cDNA del gen *LYT1* con la parte correspondiente del DNA genómico, aparecían una serie de diferencias en la región codificante. También se observó, a través de análisis en *blot* cromosómico, que el gen *LYT1* localizado en los cromosomas homólogos VI, de 1.6 Mb y XII, de 1.03 Mb, hibridaba de manera diferente en ambos cromosomas cuando se utilizaba la sonda correspondiente a la región 3', apareciendo una señal de mayor intensidad en el cromosoma XII Utilizando DNA genómico de parásitos salvajes y parásitos mutantes simples, en los que, al realizar experimentos de sustitución génica, quedaba retenida una de las dos copias alélicas, se comparó por *Southern* (figura V.3) el patrón de restricción, apareciendo bandas alternativas en el caso del DNA de la cepa salvaje, lo que posiblemente correspondía a diferencias que podían hallarse en el otro alelo del gen (respecto al del mutante simple). Teniendo en cuenta la posibilidad de que esas diferencias pudieran ser debidas a la existencia de distintas copias alélicas, o a polimorfismos que se presentan normalmente cuando se secuencian varias copias de un mismo gen procedente de una población de parásitos, se realizó el clonaje y secuenciación de ambos alelos del gen. El análisis de las secuencias nucleotídicas correspondientes a cada uno de ellos, mostró diferencias en la región 3', que se traducían en la existencia o ausencia de diferentes sitios de restricción, utilizándose la ausencia o presencia del sitio *Pst* I de la posición 2999 de la región 3' del gen para distinguir a los que se denominó alelo a y b, respectivamente. A nivel de la secuencia de nucleótidos se observaron diferencias entre ambos alelos sobre todo en la región 3' de las secuencias. Cuando se comparó la secuencia aminoacídica derivada de cada alelo entre sí y con la secuencia derivada de la cepa Y, se observó que los cambios en la secuencia se traducían en cambios de aminoácidos individuales de distinto tipo que afectaban sobre todo a la secuencia derivada del alelo *LYT1a*, se concentraban principalmente en la región 3' de la proteína, y eran del tipo no



conservativo. Aunque la identidad entre las secuencias de ambos alelos era de un 84%, al estar concentradas las diferencias en la zona donde la sonda hibridaba de forma diferencial entre los cromosomas, se consideró la existencia de cierto polimorfismo en la secuencia, aunque no se podían considerar dos copias alélicas diferentes, que podía ser significativo como para explicar las diferencias observadas en el *blot* cromosómico. Se concluyó que el alelo a se localizaría en el cromosoma VI, mientras que el alelo b estaría localizado en el cromosoma XII.

El polimorfismo alélico de diferentes cepas de *T. cruzi* [Gibson y Miles., 1986; Aymerich y Goldenberg., 1989] así como la existencia de cromosomas homólogos de diferente tamaño [Henriksson y col., 1990] ha sido descrito previamente en cepas clonadas y salvajes. Diferentes estudios en *T. cruzi* han obtenido resultados similares para otros genes como el gen de la DHFR-TS que es de copia única y se localiza en dos cromosomas diferentes en la cepa Y [Reche y col., 1994]. Un resultado similar se obtuvo con el gen KAP en la cepa Cl Brener [Cano y col., 1995] y con los genes *Tcpgp2* y *ptr1* en las cepas Maracay y Tulahuen [Dallagiovanna y col., 1996; Robello y col., 1997]. Hay diversas teorías que pretenden explicar los mecanismos que originan las diferencias de tamaños en cromosomas homólogos. La recombinación o duplicación de copias o el aumento del número de copias de DNA satélite o genes repetitivos podría generar variaciones en el tamaño de los cromosomas [Henriksson y col., 1995]. En *P. Falciparum*, la adición o delección de elementos de repetición subteloméricos parece ser uno de los principales mecanismos de variación cromosómica [Lancer y col., 1994]. El uso de marcadores de ligamiento genético en *T. cruzi* ha sugerido la existencia de reordenamientos cromosómicos que podrían implicar un mecanismo de este tipo [Henriksson y col., 1995]. El análisis de los genes *tzcrk3* y *tzcrk1* por *Southern blot*, reveló que se trataba de genes de copia única aunque mostraban diferentes intensidades en la señal de hibridación y además daban lugar a bandas dobles al ser digeridos con la enzima de restricción *EcoR1*, lo que parecía indicar su localización en cromosomas homólogos polimórficos o que se tratara de alelos con diferente número de repeticiones (ambas características típicas del genoma de kinetoplastidos) [Gomez y col., 1998]. Por otro lado, los polimorfismos debidos a la población de parásitos con la que se trabaja tienen lugar frecuentemente en *T. cruzi*, ya que las poblaciones son esencialmente clonales en su origen, y los parásitos se duplican por fisión binaria, con muy poco, si existiera, intercambio sexual de material genético durante su ciclo de vida [Di Noia y col., 1996]. Al no existir meiosis no







## VI.2 TRANSCRIPCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL GEN *LYT1*

Al caracterizar el producto de transcripción del gen *LYT1*, se comprobó por *Northern blot* la presencia de un transcrito de aproximadamente 1.7 Kb en la fracción poliadenilada de amastigotes, y un transcrito de menor tamaño (aproximadamente de 1.2 Kb) en tripomastigotes (y con menor intensidad en epimastigotes). Este resultado hizo que se pensara en la posibilidad de que existiera un procesamiento diferencial para el RNA mensajero del gen y que fuera dependiente de estadio.

Al contrario de lo que ocurre con la mayoría de los eucariotas, las secuencias que codifican proteínas en los tripanosomas están organizadas en unidades de transcripción policistrónicas que pueden contener o genes únicos o repetidos en tandem [Gonzalez y col., 1985; Imboden y col., 1987; Muhich y Boothroyd., 1988]. Los transcritos primarios policistrónicos se convierten en RNAm monocistrónicos traducibles a través de los procesos de “*trans splicing*”, que tiene lugar en el extremo 5’, y de la poliadenilación en el extremo 3’ [Huang y Van der Ploeg., 1991a]. La reacción de “*trans splicing*” consiste en la adición de una secuencia de 39 nucleótidos (denominada miniexón) al extremo 5’ de cada RNAm. A partir de estudios realizados sobre la secuencia del cDNA y análisis genéticos, se sabe que el dinucleótido AG (altamente conservado) y una o más colas de polipirimidinas son importantes elementos que, actuando en *cis*, están implicados en la selección del sitio 3’ aceptor de “*splicing*”, y que parecen influir también en el proceso de poliadenilación del gen corriente arriba [Huang, 1991b y Van der Ploeg., 1991b; Matthews y col., 1994; Schürch y col., 1994; Vasella y col., 1994; Hummel y col., 2000]. Aunque el proceso de “*trans splicing*” es bastante preciso, hay ocasiones en que se puede usar más de un sitio aceptor de “*splicing*” 3’ dentro de la región intergénica, y momentos en los que el “*splicing*” ocurre en sitios aceptores diferentes del dinucleótido AG [Kapler y col., 1987; Deshler y Rossi., 1991; Vasella y col., 1994]. Se ha comprobado la hipótesis de la existencia de una especie de sistema de escáner respecto a las secuenciasceptoras de “*splicing*” y las secuencias determinantes de los sitios aceptores. En principio, parece que se utiliza el primer par AG más cercano a una cola de polipirimidinas. Pero se ha visto que puede seguir existiendo “*splicing*” en sitios AG posteriores al principal y en distintos grados de concentración posterior del transcrito. Parece que puede depender de: la cola de polipirimidinas, de su estabilidad, de su calidad, del tamaño, de la distancia entre unos sitios y otros AG, de la



combinación de estos factores, etc. Otra posibilidad es que la estructura secundaria del precursor de RNA podría afectar la disponibilidad de un sitio consenso para ser reconocido por la maquinaria de "splicing" [Hummel y col., 2000]. Así, estudiando la secuencia del gen *tzcrk3* se observó que se producían 2 transcritos con la misma pauta abierta de lectura pero diferente región 5' no traducida (UTR). *Tzcrk1* mostraba a su vez 4 transcritos con igual ORF pero diferente UTR. Se demostró que eran diferentes en longitud debido al uso de diferentes sitios AG como aceptores de "splicing" a través de un proceso de "splicing" alternativo [Gomez y col., 1998]

Basándonos en estos resultados analizamos la secuencia 5' flanqueante y una parte de la secuencia codificante del gen *LYT1* (figura V.10), y observamos la existencia de dos regiones ricas en polipirimidinas que podrían dirigir el proceso de "splicing" hacia dos posibles sitios, originando así una situación de "splicing" alternativo. Como se muestra en la figura V.12, se confirmó que el proceso de "trans-splicing" estaba ocurriendo en las posiciones -46 y -14 de la región que flanquea el extremo 5' corriente arriba del ATG en posición +1 de *LYT1* (considerando el primer ATG que continuaba la fase abierta de lectura que coincidía con la determinada por la  $\beta$ -galactosidasa del clon de cDNA  $\lambda$ gt11-*LYT10.8*, como ATG iniciador de la transcripción). Además se observó una banda cuyo tamaño correspondía a la adición del miniexón en la posición +10 dentro de la pauta abierta de lectura del gen. El proceso de "splicing" en la posición -14 estaba ocurriendo en el dinucleótido GG, que ya había sido descrito anteriormente como un sitio potencialmente activo como aceptor del miniexón [Hummel y col., 2000]. Sin embargo, el proceso en esta secuencia parecía ser minoritario, como lo demostró su baja detección en el gel de la figura V.11, donde ni siquiera se tiñó con bromuro de etidio, teniendo que esperar al clonaje para poder observar su existencia. En resumen, en *Trypanosoma cruzi* y como resultado de un proceso de "trans splicing" alternativo, se producen tres diferentes RNAm del gen *LYT1*: dos de ellos dan lugar a la proteína *LYT1* completa (cuando el "splicing" ocurre en la posición -46 y -14). Cuando la adición del miniexón ocurre en la posición +10 se origina un RNAm que codifica una forma truncada de la proteína que pierde una posible secuencia señal, que comprende los primeros 28 aminoácidos de la secuencia completa de la proteína. Todas las variantes que se producen debido a las diferentes posibilidades en el "splicing" de los RNAm del gen *LYT1* pueden ser producidas por ambos alelos del gen, como se deduce al comparar las diferentes secuencias de cDNAs con las de los alelos, estando las zonas no



traducidas muy conservadas en ambos. Se ha relacionado este hecho con la existencia de cierta restricción en esas secuencias, lo que corresponde a posibles requerimientos para el procesamiento del RNAm, estabilidad o la regulación dependiente de estadio [Di Noia y col., 1998] La utilización del sitio GG como aceptor del miniexón, presente en la secuencia de los dos alelos, parece venir determinado por la existencia de una cola de pPy secuencia arriba del mismo, y es minoritario.

En el trabajo de investigación de esta tesis se han podido ampliar y caracterizar los diversos fenotipos que producen los mutantes nulos para el gen como son el desarrollo de infecciones deficientes, cambio de estadio acelerado *in vitro*, y una disminuida actividad hemolítica a pHs ácido, cuando se comparan con la cepa salvaje. En este sentido estaríamos ante la cuestión de cómo una misma proteína, LYT1, parece capaz de estar controlando y/o interviniendo en procesos biológicos diversos.

- Una posibilidad es que la proteína LYT1 sea un factor que se encuentre en una ruta de señalización común a procesos diferentes regulando la expresión de múltiples genes que codifican proteínas de diversa función. De acuerdo con esta idea está el hecho de que la proteína LYT1 presenta una secuencia de localización nuclear homóloga a la NLS del antígeno T del virus 40 del mono (figura V.9), lo cual otorga mucho sentido a la hora de considerar a LYT1 como un posible factor nuclear influyente en la transcripción de otros genes.
- Otra posibilidad, que es la que se propone en esta discusión, viene dada por la existencia potencial de múltiples sitios aceptores de splicing 3', que, si fueran usados, conducirían a la expresión de diferentes formas derivadas de la proteína LYT1. Una de estas formas llevaría una posible secuencia señal en el extremo amino. Otra de las formas perdería esta secuencia como consecuencia de la reacción de *trans-splicing* dentro de la secuencia codificante de la proteína, lo que conduciría a trasladar el sitio de inicio de la transcripción al codon ATG en la posición +85 dentro de la secuencia codificante en sí. Como consecuencia de lo anterior, existe la posibilidad de que se produzcan dos formas de la proteína: una forma secretada (que estaría de acuerdo con los datos obtenidos referentes a la capacidad lítica de la proteína); y otra nuclear (que estaría de acuerdo con una posible función en el desarrollo de los estadios del parásito durante su ciclo de vida). La secuencia de localización nuclear está presente tanto en la forma de la proteína que pierde la



secuencia señal como en la que no, por lo que las dos formas de la proteína podrían tener localización nuclear. Lo que ocurre es que la que tiene la secuencia señal tendría la posibilidad de ser secretada o de membrana, mientras que la que no lo tiene, estaría restringida a localizarse en el citosol o en el núcleo, si esta señal estuviera siendo utilizada. Esto quiere decir que existe la posibilidad de que según donde ocurra el proceso de "splicing" se produzcan dos formas de la proteína *LYT1* que podrían tener una localización diferente, esto es, la forma completa en la membrana o secretada, y la forma truncada en el núcleo. Esa compartimentalización podría ser la razón de que la misma proteína pueda relacionarse con los procesos de actividad lítica y desarrollo.

Es posible que la forma completa y la forma truncada de la proteína lleven a cabo funciones específicas de estadio. Cuando se estudia la actividad hemolítica, se observa que ésta es mayoritaria en amastigotes. Consecuentemente, es probable que la forma secretada sea producida preferencialmente en este estadio. Cuando se llevó a cabo el análisis de los tres RNAm en las diferentes formas de desarrollo del parásito se observó que los aspectos del procesamiento alternativo estaban regulados diferencialmente durante el ciclo de vida del parásito. En general, la cantidad de RNAm del gen *LYT1* era mayor en la forma amastigota que en las otras dos, sugiriendo que la expresión de este gen pudiera estar sobre regulada en esta forma del parásito. Por otro lado, el transcrito que codifica la forma de la proteína *LYT1* completa (producto de RT-PCR de 329 pb) representa el 65% del total del RNAm del gen *LYT1* en tripomastigotes y amastigotes, pero solo el 10.5% en epimastigotes. Esto quiere decir que, mientras que en tripos- y amastigotes la forma mayoritaria en la que se encuentra la proteína *LYT1* es una forma que presenta una posible secuencia de secreción de la proteína, en epimastigotes la proteína *LYT1* mayoritariamente no presenta esa secuencia señal y se localizaría intracelularmente. De acuerdo con los resultados obtenidos parece que lo que decide una u otra opción es, por un lado el estadio del parásito, y por otro las condiciones ambientales, esto es el pH. Es decir, que en tripos- y amastigotes la forma de la proteína mayoritaria es secretada, siendo activa a pH ácido; mientras que en epimastigotes, la forma intracelular de la proteína *LYT1* sería activa a pH neutro. En este sentido, *LYT1* es una proteína de naturaleza hidrofílica y posee una alta proporción de aminoácidos cargados y polares, que podrían sugerir que la exposición de dominios funcionales en cada forma de la proteína podrían depender de cambios conformacionales inducidos por el pH en cada



situación. Respecto a la regulación génica dependiente de estadio, parece que está relacionada con el hecho de que ciertos genes pueden ser tóxicos en un ambiente y no en otro, tanto para el parásito como para el hospedador en cada caso. Se piensa que los mecanismos de regulación post-transcripcional estadio específicos podrían haberse desarrollado después de que los genes evolucionaran a partir de un gen ancestral. Un ejemplo son los miembros de la familia génica gp85, que utilizan diferentes mecanismos para el control de su expresión en las formas sanguíneas o metacíclicas [Nozaki y Cross., 1995]. Por lo tanto, resulta que ambas formas de la proteína LYT1 se están produciendo en todos los estadios aunque predomine una u otra forma dependiendo del estadio. El hecho de que existan dos transcritos codificando la misma proteína podría estar asociado con el hecho de la disponibilidad de proteínas para un momento dado del ciclo celular, o para establecer un balance entre la síntesis y la degradación de varios mensajeros diferentes en su estabilidad [Marañón y col., 1998].

Un ejemplo parecido a lo que ocurre con el gen *LYT1*, se encuentra en el gen Tc45. Se trata de una prolin racemasa con una secuencia señal de 29 aminoácidos. El gen presenta un posible sitio aceptor de "splicing" en las posiciones 56 y 7 aguas arriba del codon de iniciación, y un "splicing" alternativo 170 pb aguas arriba del segundo codon para ATG dentro de la región codificante. Si se usa este último sitio, se origina una forma de la proteína truncada, no secretada, que pierde 69 aminoácidos. Se observó que existía una forma intracelular de la proteína codificada por el gen, y que la secreción de la misma ocurría sólo en las formas infectivas. La expresión diferencial de la forma secretada y la intracelular podría ocurrir porque la traducción ocurra a partir del primer o del segundo ATG, o que las dos copias génicas sean diferencialmente expresadas [Reina-San-Martin y col., 2000]

Las formas infectivas del parásito, tripomastigotes, entran en la célula a través de un proceso que implica la formación de una vacuola fagolisosómica. El parásito debe romper la vacuola y pasar al citosol para replicarse como amastigote. El conjunto de acontecimientos que comprenden ruptura de la vacuola y transformación de tripomastigote a amastigote no se conoce. Por lo tanto, y teniendo en cuenta los fenotipos observados, la forma completa de la proteína, que se produce mayoritariamente en las formas intracelulares, amastigotes y tripomastigotes, podría estar siendo secretada por estos estadios o bien podría ser activa directamente desde la membrana de parásito, actuando en la ruta lítica de ruptura de la vacuola fagolisosómica. Además, la proporción existente de la forma truncada de la proteína podría determinar, en su



defecto, la activación o represión de genes específicos de estadio que controlaran el cambio de estadio de tripomastigotes a amastigotes. Por otro lado, en el caso de los epimastigotes, la forma mayoritaria es la forma truncada de la proteína. Este estadio del parásito no se encuentra con la dificultad de romper ninguna membrana intracelular, pero en cambio sí sufre un proceso de cambio de estadio profundo que se denomina metaciclogénesis, a través del cual se transforma en la forma infectiva en el hospedador vertebrado. Puede que la mayor proporción de la forma no secretada de la proteína en este estadio actúe, en este caso, disparando o inhibiendo la expresión, directa o indirectamente, de los genes específicos implicados en los procesos que permiten el cambio de estadio.



### VI.3 ESTRUCTURA PRIMARIA Y MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LYT1

Utilizando los programas y bases de datos apropiadas no se encontró homología significativa ni para LYT1 ni para ORF A, aunque ORF B presentó un 57% de identidad con la región de clase III del locus mayor de histocompatibilidad, que codifica para el factor B y los componente C2 y C4 del complemento, entre otros. También mostró un 58% de identidad con el gen que codifica para el componente C4A del complemento de *Mus musculus*. Debido a la relación de LYT1 con el componente C9 del complemento, tanto a nivel de reconocimiento inmunológico como a nivel funcional, esto podría tener importancia a la hora de confirmar esa relación, considerando que LYT1 podría formar parte de una unidad génica en la que estuvieran representados genes que codificaran proteínas relacionadas entre sí inmunológicamente y con una posible función conjunta en la ruta lítica utilizada por el parásito en su desarrollo intracelular.

El hecho de que LYT1 no muestre homología significativa con ninguna proteína o producto de transcripción conocido es bastante sorprendente considerando la reactividad inmunológica cruzada con anti-C9 y anti-TcTOX. Sin embargo, existen bastantes ejemplos de proteínas que, poseyendo actividad lítica, no presentan homología aparente con otras proteínas formadoras de poros. Por ejemplo, la perforina posee una homología no significativa del 21% con C8 $\alpha$ , del 19% con C7, y del 17% con C8 $\beta$  y C9, todos ellos componentes del complemento [Haefliger y col., 1987; Rao y col., 1987; Howard y col., 1987; Shinkai y col., 1988; Lichtenheld y col., 1988; Kwon y col., 1989 #5265]. La melitina, péptido soluble con actividad hemolítica presente en el veneno de las abejas, presenta características estructurales y funcionales similares a C9. En este caso también existe reconocimiento inmunológico ya que anticuerpos frente a melitina reaccionan con C9 [Laine y col., 1988]. La comparación de las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas reveló una homología pequeña y discontinua entre los residuos 8-11 y 12-16 de la melitina y los péptidos 293-296 y 528-532 de C9, respectivamente. Estas secuencias no lineales forman un epitopo conformacional presentado por C9 humano en su forma plegada nativa que es reconocido por anti-melitina [Laine y Esser., 1989]. En un trabajo anterior se observó que LYT1 poseía una secuencia que presentaba cierta homología con la secuencia que anti-melitina reconoce en C9, en la que parece que el dipéptido Leu-Pro parece tener un papel importante. De hecho se ha postulado que la isomerización de *cis* a *trans* de la unión Leu-Pro puede ser el



componente principal en la función biológica de estas proteínas tan diversas [Brandl y Deber., 1986]. Un caso opuesto en el reconocimiento inmunológico es el que se observa entre la ubiquitina humana y la de *T. cruzi*. Entre ambas sólo existe una diferencia en la secuencia de 3 aminoácidos, pero que son suficientes para que el suero de un paciente infectado reconozca la del parásito pero no reconozca ni la humana ni la de otro parásito intracelular como es el caso de *Leishmania*. Por ello se piensa que se puedan crear epitopos específicos de especie [Telles y col., 1999]. En este sentido, éstos podrían estar formando parte de las diferencias entre proteínas con la misma función pero diferente homología y en el caso del reconocimiento inmunológico cruzado, lo que se propone, es la existencia de epitopos conformacionales comunes entre proteínas que con la misma función presentan importantes diferencias en su estructura primaria.

Por otro lado existen proteínas formadoras de poros que no presentan ningún tipo de homología o reconocimiento inmunológico con otras y que se han establecido en familias independientes. Es el caso de las amebaporos de *Entamoeba histolytica*, tres péptidos con actividad formadora de poros localizadas en los gránulos citoplasmáticos [Lynch y col., 1982; Young y col., 1982].

Todo ello conduce a la conclusión de que, hasta el momento, no se han determinado experimentalmente los requerimientos de una proteína para que presente actividad lítica. Desde un punto de vista teórico, parece que se necesita una región de unión potencial a membranas con afinidad lipídica débil para evitar quedar atrapada en la membrana del retículo endoplasmático durante el proceso de biosíntesis, un dominio de anclaje a membranas que debe ser anfipático para asegurar la formación de un canal hidrofílico y algunas características estructurales que permitan la polimerización de los monómeros. En la práctica estas características no pueden localizarse en la mayoría de las PFPs. Se ha propuesto un modelo en la formación de poros en las membranas que intenta explicar la diversidad de moléculas con esta función. Según este modelo, es posible que las PFPs tengan una región central conservada que está relacionada con los requerimientos de anfipicidad del poro, y dominios variables que serían típicos de cada PFP [Ojcius y Young., 1991]. Los dominios variables podrían conferir la especificidad de unión a lípidos o proteínas. Por lo tanto, una nueva molécula con características funcionales comunes con otras proteínas formadoras de poros, aunque no presente homología aparente en su secuencia, no puede





excluirse como una nueva clase de proteína formadora de poros, que podría presentar epitopos no lineales alejados en la secuencia y difíciles de localizar.

Se ha observado que algunas de estas proteínas presentan importantes diferencias entre sus puntos isoeléctricos. Aunque en principio se esperaría que proteínas con funciones parecidas tuvieran puntos isoeléctricos semejantes, no se sabe cómo afectan estas diferencias a la actividad biológica de las PFPs. Este hecho se produce también en el factor de elongación Tu [Neidhardt y Philips., 1984], cuyo punto isoeléctrico difiere según sea procariota o eucariota, y con proteínas MIP de diferentes organismos [Moro y col., 1995].

Analizando la secuencia primaria de LYT1 con los programas informáticos adecuados, se observaron los diferentes motivos en la secuencia que potencialmente podían ser susceptibles de sufrir modificaciones, representados en la figura V.9, y se intentó determinar la importancia de tales modificaciones en la actividad biológica de la proteína. Utilizando una base de datos de familias y dominios proteicos (PROSITE, <http://us.expasy.org/prosite>), se localizaron sitios en la secuencia capaces de sufrir procesos de amidación, fosforilación, miristilación y glicosilación.

El programa informático anterior describe la región que va desde el aminoácido 479 al 482, susceptible de sufrir amidación. En este proceso, la glicina proporcionaría el grupo amida, y los residuos básicos que hay a continuación (lisinas) han sido descritos como el sitio donde ocurre la ruptura que conduce a la formación de un péptido activo. Aunque todos los aminoácidos pueden ser amidados, los residuos neutrales o hidrofóbicos son mejores para el proceso que los residuos cargados. Sin embargo, la amidación C-terminal no se ha demostrado, hasta ahora, en organismos unicelulares o en plantas [Kreil G., 1984; Bradbury y Smyth.,1987]. Pero el hecho de que este proceso esté presente en los acontecimientos que conducen a la activación de precursores de hormonas y otros péptidos, hace pensar que quizás éste sea uno de los procesos implicados en la activación diferencial de cada forma de la proteína LYT1.

Otro tipo de modificación proteica que se produce como respuesta a señales intra- y extracelulares y que deriva en la activación o inactivación de las proteínas es la fosforilación. En la secuencia de LYT1 existen numerosos sitios susceptibles de ser fosforilados por diferentes enzimas como protein kinasa C [Kishimoto y col., 1985; Woodget J.R y col.,1986], kinasas dependientes de AMPc o GMPc, [Fremisco y col., 1980; Glass y Smith., 1983; Glass y col., 1986] y caseín kinasa II [Pinna., 1990]. Como aparece en la figura V.9,



hay sitios que se solapan en cuanto a las condiciones particulares de fosforilación en cada caso. De hecho, y utilizando el programa NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) de predicción de los sitios de fosforilación en las proteínas eucarióticas para los residuos de serina, threonina y tirosina, se determinaron 29 residuos de serina y 13 de threonina susceptibles de ser fosforilados.

La glicosilación es una de las formas más abundantes de modificación covalente de una proteína o lípido. Parece que tiene lugar en la mayoría de las proteínas integrales de membrana y en las proteínas de secreción, desempeñando un papel esencial en la regulación del estado funcional de la célula, en procesos de interacción intracelulares, en la adhesión celular y en la activación de enzimas específicas. Implica la unión de grupos de carbohidratos a residuos de serina o threonina, en el caso de la O-glicosilación, o a residuos de asparagina en el caso de la N-glicosilación. En este sentido, en LYT1 se han descrito dos posibles regiones (entre los aminoácidos 312-315 y 390-393) donde existe la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, susceptible de sufrir N-glicosilación [Marshall., 1972]. Sin embargo, se ha descrito que la presencia de esta secuencia no es suficiente para que el residuo de asparagina sea glicosilado debido al hecho de que el plegado de la proteína juega un papel importante en la regulación de la N-glicosilación [Pless y Lennarz., 1977]. Por otro lado, las regiones anteriormente mencionadas presentan una prolina carboxiterminal respecto a la threonina, en el primer caso en la posición 314, y respecto a la serina, en el segundo caso en la posición 392. Se ha descrito que el 50% de los sitios con una prolina carboxiterminal respecto a los residuos de serina/threonina no son glicosilados [Gavel y von Heijne., 1990].

Las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos son importantes para la conformación y función de las proteínas. La mayor parte de las cadenas laterales hidrofílicas, cargadas o polares, se encuentran expuestas en la superficie de las proteínas, mientras que las no polares e hidrofóbicas aparecen escondidas en el interior de las proteínas fuera del contacto con el agua. LYT1, con un 61.7% de sus aminoácidos cargados y polares, se puede considerar una proteína de naturaleza hidrofílica. Algunas proteínas contienen ciertas regiones altamente enriquecidas en uno o varios aminoácidos [Wootton y Federhen., 1996]. En LYT1 se puede observar una región rica en glutamina (aminoácidos 232-244) y una región rica en prolina (aminoácidos 416-423). La glutamina presenta sus cadenas laterales altamente polarizadas, lo que influye en que mantienen frecuentemente el segmento de la cadena polipeptídica en el que se encuentran plegado en contacto con la fase acuosa [Rawn,



1989]. Además, como el resto de aminoácidos polares no cargados, las cadenas laterales de glutamina pueden entrecruzar proteínas plegadas mediante enlaces de hidrógeno. Respecto a la prolina, su estructura difiere radicalmente de la de otros aminoácidos debido a que su cadena lateral está unida al nitrógeno además de al carbono  $\alpha$ . Aunque la prolina no es reactiva químicamente, su cadena lateral, un anillo de pirrolidina, restringe la geometría del esqueleto de la cadena de proteína que la contiene, introduciendo, en algunas ocasiones, cambios bruscos en la dirección de la cadena [Rawn, 1989]. Se ha descrito que la presencia de prolina en una cadena polipeptídica puede intervenir en la interacción de ésta con las membranas biológicas a través de la formación de puentes disulfuro.

Un número importante de proteínas eucarióticas son aciladas a través de la adición covalente de miristato (un ácido graso saturado C14) a un residuo aminoterminal (glicina) a partir de un enlace amida [Towler y col., 1988; Grand., 1989]. La miristilación parece intervenir en facilitar la unión a membranas, al menos temporalmente, y/o en las interacciones proteicas. Como se comentó anteriormente, LYT1 parece intervenir en procesos biológicos distintos a través de dos posibles formas de la proteína producidas por "splicing" alternativo. Por un lado, el hecho de que una forma de la proteína tenga 28 aminoácidos menos en su extremo aminoterminal, puede influir en la actividad de la misma. En la bacteria patógena *E. histolytica* se describió una PFP que compartía un 95% de homología con una PFP purificada de una cepa no patógena, cuya actividad hemolítica se había reducido en un 60%. Este fenómeno se relacionó con cambios en la estructura, de modo que, entre ambas proteínas solo había 4 aminoácidos diferentes, de los que dos originaban cambios conservados. Otra sustitución era de una serina por un aspárticos, lo que introducía una carga negativa adicional en la segunda hélice de la molécula. El otro cambio era un residuo de glutámico por una prolina, que redujo la longitud de la hélice anfipática. Todo esto podría explicar el cambio en la actividad, lo que tiene que ver con la diferencia en la capacidad patogénica de ambas cepas [Leippe y col., 1993]. En el caso de LYT1 se trataría de la misma proteína pero con tamaños diferentes, y por lo tanto, con posibles cambios en la conformación final, que podría explicar cambios en el destino y la actividad de ambas formas de la proteína. Pero además, el hecho de que la misma proteína forme parte de dos acontecimientos celulares diferentes puede ser explicado si consideramos el efecto que las modificaciones post-traduccionales pueden tener en la actividad de la proteína. La síntesis de la forma completa o truncada de la proteína y la conformación adoptada, puede originar la



exposición o no de residuos que pueden o no ser afectados por estas modificaciones, y por lo tanto dirigirse a un tipo de proceso u otro. Parece que en este tema es de vital importancia el pH del medio en el que se encuentra la proteína, corroborando la hipótesis anterior, ya que el pH estaría determinando la exposición o no hacia el medio de determinadas cadenas laterales y por tanto su susceptibilidad a ser modificadas. En este sentido se ha descrito para TcTOX que, puesto que se ha localizado en sobrenadantes del parásito a pH 7.0 y pH 5.5, lo que induce a pensar que parte de TcTOX podría ser presintetizada y almacenada intracelularmente y que indica que el pH no es un requerimiento para su secreción, el pH ácido podría intervenir en el hecho de que la actividad hemolítica se dispare por cambios conformacionales que ocurran por el polipéptido secretado a ese pH [Andrews y Whitlow., 1989; Andrews y col., 1990]. La importancia del pH en proteínas formadoras de poros se ha descrito en otros organismos patógenos. Así, parece que el pH es un elemento regulador de la secreción y de la actividad hemolítica *Trichomonas vaginalis*, que muestra actividad hemolítica en fracciones ácidas. Parece que el factor hemolítico se halla preformado y almacenado en el interior celular y se activa por pH ácido [Fiori y col., 1996]. También se ha observado que la ruptura de fagosomas de macrófagos por LLO de *L. monocitogenes* es dependiente de pH ácido [Beauregard y col., 1997]. Estudiando las porinas de *E. coli* se ha propuesto que forman estados de canales abiertos de tamaños variables que corresponden a una conformación estructural única. Es el pH el que induce el cambio de un estado a otro. Un aumento en el pH induce un cambio desde un conjunto de pequeños a grandes tamaños del canal, lo que implica al pH en los cambios conformacionales propuestos [Todt y col., 1992]. LYT1 es una proteína altamente hidrofílica. Sin embargo, la presencia de la región rica en prolinas, y la susceptibilidad de sufrir procesos de miristilación y glicosilación, pueden determinar su interacción y/o presencia con moléculas de la membrana plasmática. Por otro lado, los procesos de amidación y fosforilación hacen que se piense en LYT1 como una proteína que interviene en una posible vía de transducción de señal.

El efecto de las modificaciones post-traduccionales se ha observado en algunas PFPs, que necesitan ser activadas para desarrollar su máxima actividad. Esto puede implicar la ruptura proteolítica de un precursor inactivo, la eliminación de un inhibidor, la acilación de la proteína seguida de la unión de determinados iones, o la reducción de puentes disulfuro. En el caso de la leishporina, actividad citolítica con pH óptimo 5.5 descrita en *L. amazonensis* [Noronha y col., 1994; Noronha y col., 1996], se han propuesto dos hipótesis para explicar



su activación: que ocurra por proteólisis de un precursor inactivo o por disociación y/o degradación proteolítica de un inhibidor con la liberación de la molécula activa. Los experimentos realizados parecen indicar que es el último proceso el que tiene lugar [Horta y col., 1997]. Pues bien, recientemente se describió que las especies de leishmania tenían diferentes actividad citolítica: *L. amazonensis* y *L. major* muestran una considerable actividad citolítica, mientras que *L. panamensis* o *guayanensis* poca o ninguna, respectivamente. Parece que existe un componente citosólico proteico con actividad serin proteasa necesario para la activación de la citolisina (apoyando la hipótesis de activación de la PFP por degradación proteolítica de un inhibidor), y que la diferencia entre las especies reside en el hecho de que *L. amazonensis* y *guayanensis* tienen distintas formas inactivas de leishporinas [Almeida-Campos y Horta., 2000]. Es decir, que aún siendo la misma proteína su estado activo o inactivo depende de una posible conformación o asociación diferencial con un componente celular, de modo que diferencias en ese estado conduce a que puedan o no ser activadas por corte proteolítico .

Según todos estos datos, se podría especular que, en el caso de LYT1, podría ser que se produjeran preferentemente uno u otro tipo de modificaciones dependiendo de la conformación de la proteína, que a su vez podría depender de las condiciones en las que se encuentre el parásito en ese momento, esto es, como amastigote en el interior de la vacuola, pH ácido; o como epimastigote, en un proceso de cambio de estadio, con pH intracelular neutro. Estas condiciones determinarían la forma mayoritaria de LYT1 expresada y, por tanto, la función concreta a desempeñar en el ciclo de vida de *T. cruzi*.



#### **VI.4 EXPRESIÓN DE LYT1**

Como se describió en su momento [Cortés.A, tesis doctoral, 1998], la proteína LYT1 mostraba una enorme labilidad a la hora de ser sometida a procesos de expresión y purificación. Aún así, quisimos intentar la expresión de la proteína completa en ausencia de la hipotética secuencia de secreción. Las secuencias señal han sido descritas como elementos de influencia en los procesos de expresión de proteínas en sistemas heterólogos bacterianos, ya que pueden dirigir las proteínas en formación hacia el espacio periplásmico, lo que hace muy difícil su recuperación y lo que origina un bajo rendimiento en la producción de la proteína de interés. Por otro lado, y considerando que las diferencias entre las formas alélicas se reflejaban preferentemente en diferencias derivadas en la región carboxiterminal en las secuencias aminoacídicas respectivas, se pensó en la expresión de esta región de la proteína con la intención de obtener anticuerpos específicos, que dirigidos contra esa zona de la proteína, pudieran ayudar a distinguir diferencias, si las hubiera, en combinación con los anticuerpos obtenidos previamente frente a la región aminoterminal.

La expresión de ambas construcciones se llevó a cabo como proteínas de fusión, en el sistema heterólogo de *E. coli*. Ya que se conocía que muchas proteínas de fusión son altamente sensibles a la degradación proteolítica, y que parece que OmpT es responsable de la degradación de diversos péptidos, actuando sobre pares de residuos básicos, dependiendo de la conformación proteica y del pH [Grodberg y Dunn., 1988; Sugimura y Higashi., 1988; Baneix y Gergiou., 1990], se decidió utilizar la cepa BL21(DE3) deficiente en el gen estructural *ompT*. Sin embargo, la expresión de ambas construcciones reveló que OmpT no era el único factor responsable de la degradación, ya que en todo el proceso se obtenían, en distinto grado, degradación de las proteínas que estaban siendo expresadas y purificadas (figuras V.19 y V.20). Después de optimizar los distintos parámetros, se obtuvo un rendimiento muy bajo en la purificación de la proteína LYT1 sin secuencia señal, lo que se atribuyó principalmente a la degradación de la proteína y al hecho de que se pegaba con muy poca afinidad a la columna, probablemente por formación de estructuras secundarias que podían enmascarar el dominio GST, debidas a cambios en la temperatura o el pH durante el proceso. Por otro lado, el corte con trombina de la proteína pGEX2T-LYT1Ct permitió obtener el péptido carboxiterminal de 28.4 KDa, que se utilizó para la obtención de anticuerpos.



La inmunodetección en lisados totales de parásitos salvajes utilizando el anticuerpo frente a la región carboxiterminal de la proteína reveló dos bandas principales de aproximadamente 60.2 y 56.7 KDa, respectivamente, en todos los estadios del ciclo de vida del parásito. La ausencia de cualquier banda en el caso de lisados de parásitos mutantes nulos deficientes en el gen, indicó que ambas bandas pertenecían específicamente a la proteína LYT1 (figuras V.23 y V.24). Cuando se usaron los anticuerpos frente a los primeros 250 aminoácidos de la proteína (anti-LYT1Nt), anti TcTOX o anti-C9 con lisados totales de mutantes nulos no se observaron diferencias respecto al reconocimiento antigénico frente a lisados totales de parásitos salvajes (figura V.21, Cortés,A.; tesis doctoral, 1998). Es decir, que ninguna de las bandas reconocidas por los anticuerpos anteriores pudo ser identificada como LYT1 ya que ninguna desaparecía en los mutantes nulos. Sin embargo, anti TcTOX (figura V.17) y anti C9 [Cortés,A., tesis doctoral, 1998] reconocieron a la proteína recombinante GST-LYT1. Todo esto conduce a pensar en la existencia de una familia de proteínas caracterizadas por un reconocimiento inmunológico cruzado con anti-C9, anti Tc-TOX y anti-LYT1Nt. Aunque no se puede afirmar que el reconocimiento inmunológico de una proteína por anti-C9 sea una garantía de su actividad lítica, sí es cierto que numerosas moléculas, entre las que se encuentran LYT1 y TcTOX, cumplen esta premisa. Por lo tanto, proteínas del mismo tamaño que LYT1 (algo común entre las PFPs y a considerar si estuviéramos hablando de una familia de proteínas relacionadas en la formación de poros en *T. cruzi*), presentes tanto en los parásitos salvajes como en los mutantes nulos, podrían estar siendo reconocidas inmunológicamente por los anticuerpos anteriores, enmascarando la ausencia de LYT1, de modo que no se verían diferencias entre ambos tipos de parásitos, ya que habría reconocimiento por igual en los mutantes nulos que en los parásitos salvajes. El hecho de que anti-LYT1Ct reconozca específicamente a la proteína LYT1 unido al hecho de que las diferencias observadas entre los alelos del gen se concentren en la región carboxiterminal, hacen pensar, además de corroborar la presencia de una familia de proteínas, que éstas tuvieran conservadas ciertas regiones y que mostraran diferencias en otras. En concreto, y como se muestra en la figura V.22, anti-LYT1Ct, anti TcTOX y anti-C9 comparten una región en la zona carboxiterminal de reconocimiento antigénico. Sin embargo, es en la zona anterior, reconocida específicamente por anti-LYT1Ct, donde existen importantes diferencias entre ambos alelos, sobre todo relacionadas con cambios conformacionales, como son las sustituciones de serina por prolina, de alanina por prolina, o de prolina por



leucina, que podrían dar lugar a epitopos específicos. En este caso se habla de diferencias entre alelos. Si se considera una familia de proteínas, las diferencias podrían ir en el mismo sentido, ya que éstas deberían estar suficientemente conservadas con el fin de desempeñar o intervenir en la misma función. De este modo, anticuerpos dirigidos frente a la región carboxiterminal distinguirían de manera específica a los distintos miembros de la familia, en este caso a LYT1. En este sentido, se ha descrito en la familia de proteínas semejantes a mucinas en *T. cruzi*, una alta conservación de las regiones que codifican los extremos aminoterminal y carboxiterminal, péptido líder y señal de anclaje en membranas, respectivamente, mientras que las regiones centrales son altamente variables. Estas regiones están formadas por un número variable de unidades repetidas de treonina y prolina o no repetidas de serina/treonina y prolina que susceptibles de sufrir O-glicosilación. Se ha propuesto que la región que codifica la parte central podría evolucionar rápidamente ya que solo estaría restringida a la conservación de los sitios diana para la O glicosilación. Parece que cuando se trata de familias génicas que codifican proteínas con una función similar o idéntica, los genes están relacionados con la supervivencia del parásito en el hospedador y la variabilidad en la secuencia se va seleccionando naturalmente [Di Noia y col., 1998]. Por tanto, podría ocurrir que en la familia de proteínas relacionadas con una posible vía lítica en el parásito, las zonas aminoterminal, en las que parece existir una señal de secreción y la zona carboxiterminal, se hallen conservadas respecto a las zonas centrales, que serían susceptibles de sufrir modificaciones post-traduccionales diferentes, que las distinguiera, permitiéndoles la interacción entre sí, o con la membrana en la formación del poro o que quizás implicara su actividad en algún otro proceso.

Cuando se realizó la inmunodetección de LYT1 en los diferentes estadios utilizando los lisados totales de parásitos salvajes con el anticuerpo frente a la región carboxiterminal de la proteína, se observó que todos expresaban la proteína. Sin embargo, y aunque se utilizó la misma cantidad de parásitos, la intensidad de las bandas fue diferente. Así se observa que son los amastigotes los que expresan LYT1 con mayor intensidad, seguido de los epimastigotes y los tripomastigotes. En los tres casos se producen las dos bandas descritas. Sin embargo, en parásitos metacíclicos se observa una mayor intensidad en la banda de mayor tamaño. La existencia de dos bandas principales que reaccionaban con los anticuerpos dirigidos contra LYT1 planteó la posibilidad de que no se trataran de productos de degradación sino que se estuvieran detectando probablemente las formas derivadas del





proceso de “*splicing*” alternativo. Además, el Pm teórico de la forma truncada de la proteína correspondía al Pm obtenido en el *western blot*. En este momento y considerando además los resultados producidos por los parásitos deficientes en LYT1 en las invasiones realizadas y en el cambio de estadio, se realizaron construcciones específicas para cada forma de la proteína. Se transfectaron parásitos mutantes nulos con la intención de que ocurriera una expresión diferencial de ambas formas de la proteína por separado, que nos permitiera distinguir el hecho de que cada forma de la proteína pudiera estar interviniendo en un proceso diferente en el ciclo de vida del parásito, y que nos permitiera identificar y asociar funciones con cada una de ellas en el estudio de los procesos de expresión, localización, actividad hemolítica, cambio de estadio e infectividad. El vector de expresión utilizado fue pTEXble y los insertos correspondían a la región codificante completa del gen *LYT1* y a la misma región pero sin el ATG iniciador, de modo que, utilizando el sitio aceptor de “*splicing*” determinado en la secuencia del gen de la GADPH, se forzaba la expresión de sólo la forma completa de la proteína o de la forma truncada, respectivamente. Lisados de epimastigotes expresando la construcción pTEXble-LYT1, que daría lugar a la forma completa de la proteína, y expresando la construcción pTEXble-LYT1 $\delta$ atg, que originaba la forma de la proteína que perdía los 28 aminoácidos primeros y originaba una forma sin la hipotética secuencia señal, fueron analizados con anti-LYT1Ct. En cada caso se observaron únicamente las bandas de 60.2 y 56.7 KDa, respectivamente, lo que indicó que las bandas detectadas en un principio en los parásitos salvajes correspondían al proceso de “*splicing*” alternativo. En el caso de la expresión de la forma truncada de la proteína aparecía otra banda de menor tamaño que la principal que podía deberse a degradación o modificación de la de 56.7 KDa.

La susceptibilidad de LYT1 a la ruptura, procesamiento o degradación se puso de manifiesto en el trabajo realizado en nuestro laboratorio intentando optimizar la expresión de la proteína en otros sistemas como en células LLC-MK2 y levaduras, que en ningún caso fueron capaces de expresar la proteína completa [Cortés, A., tesis doctoral, 1998]. Se intentó entonces la expresión en un sistema lo más parecido a *T. cruzi*. *Leishmania* pertenece, al igual que *T. cruzi*, a la familia Trypanosomatidae. La transformación estable con vectores plasmídicos con capacidad de replicarse libremente ha sido realizada con mayor eficacia que en *T. brucei* o *T. cruzi*. [Bellofatto y col., 1991; Kelly y col., 1992; Ryan y col., 1993]. Utilizando la construcción px63NEOLYT1, se transformaron leishmanias con la forma completa de la proteína LYT1. El vector px63NEO fue construido por LeBowitz y col. en 1991 como una



modificación del vector pRNEO original construido a partir de DNA extracromosómico del tipo región R procedente de las células R100 de *L. major*. Permite la sobreexpresión de los genes clonados, manteniéndose, bajo la presión del fármaco G418, dentro del parásito en un alto número de copias como un DNA circular extracromosómico. El análisis de lisados totales de *Leishmania tropica* con anti-LYT1Ct aportó una evidencia más a que el proceso de "splicing" estaba teniendo lugar y que ambas formas de la proteína eran capaces de ser expresadas. El uso de los sitios aceptores y donadores del proceso de "splicing" está bastante conservado entre los tripanosomátidos, por lo que se puede afirmar que *L. tropica* estaría utilizando el mismo sistema de expresión del gen *LYT1* que *T. cruzi*. Además de las dos bandas principales, se observan una serie de bandas secundarias que probablemente correspondan a un patrón de degradación de la proteína. También podría pensarse en un posible reconocimiento de anti-LYT1Ct con la porina o moléculas implicadas en la ruta lítica de *Leishmania*, en cuanto que se ha visto la capacidad de este tipo de moléculas de mostrar reconocimiento antigénico cruzado. Para intentar deducir a qué podía deberse la fragilidad de la proteína en los distintos sistemas de expresión utilizados, intentamos expresarla en un sistema biológico lo más parecido a *T. cruzi* y en unas condiciones lo más parecidas a las fisiológicas, esto es en un ambiente ácido. Para ello se utilizaron parásitos de la especie *Phytomonas serpens* cepa T10. Los parásitos se transformaron con la construcción pTEXble-LYT1, cuyo inserto correspondía a la región codificante completa del gen *LYT1*, que daba lugar a la expresión de la forma completa de la proteína. Cuando lisados de parásitos transformados se analizaron con anti-LYT1Ct, se observó la existencia de una sola banda, con un tamaño aproximado de 60.2 KDa, y ningún producto de degradación

En los distintos sistemas de expresión utilizados, células LLCMK2 y levaduras [Cortés, A., tesis doctoral, 1998], *E. coli*, *L. tropica*, y *T. cruzi* (esta tesis), aparecen una serie de productos de degradación, que no se encuentran en *P. serpens*. El hecho de que la degradación tenga lugar en sistemas biológicos dispares, que análisis de la secuencia con los programas adecuados no hayan resultado en la localización de secuencias de reconocimiento de corte por proteasas conocidas y que sea en un sistema rodeado de un ambiente ácido donde la proteína se produzca íntegramente, sugiere que LYT1 pudiera estar sufriendo un autoprosesamiento. En concreto, y en base a los resultados obtenidos, se podría pensar en un autoprosesamiento inducido por pH, lo que significaría un sistema de protección de la actividad lítica de la proteína sobre el parásito. En el proceso de rotura de la vacuola



fagolisosómica, los parásitos expresan una transialidasa, que transfiere residuos de ácido siálico desde las glicoproteínas de la membrana de la vacuola hacia la superficie del parásito. Se ha descrito que la presencia de residuos de ácido siálico en las membranas disminuye la susceptibilidad de éstas por las proteínas formadoras de poros. Puesto que la transialidasa de superficie solo se expresa en tripomastigotes, y LYT1 se expresa en los tres estadios, las formas amastigotes y epimastigotes estarían expuestas a la actividad lítica de la proteína sin protección. Por un lado, parece que un nivel de regulación de LYT1 se ejerce en el estadio del parásito en el que se produce la expresión de la proteína en cada momento, lo que está relacionado con el ambiente al que se enfrenta para completar su ciclo de vida. En el caso de los epimastigotes, parece que LYT1 se produce mayoritariamente como una forma truncada que parece estar relacionada con procesos distintos de la actividad lítica. En cambio, en los amastigotes, la forma mayoritaria de LYT1 es la forma completa de la proteína que parece intervenir en la rotura de la membrana vacuolar. Por lo tanto, otro nivel de regulación parece implicar al pH. Considerando que LYT1 tiene o interviene en la actividad lítica a pH ácido, que sería el momento en que los parásitos, principalmente tripomastigotes expresando transialidasa, se hallan protegidos en el interior de la vacuola, y que en el momento en el que se rompe la vacuola, cuando culmina la transformación de tripomastigotes a amastigotes (sin transialidasa), LYT1 queda libre en el medio intracelular, es lógico pensar que la proteína debe sufrir algún tipo de inactivación o procesamiento que evite su acción lítica en ese medio, que podría lisar la membrana plasmática de la célula antes de la replicación de los amastigotes (que también resultarían dañados), y se bloquearía el proceso de infección. En este sentido, modificaciones producidas por la exposición de ciertos residuos dependiente del cambio de conformación según el pH (como se comentó anteriormente) podrían estar regulando la proteína. Asimismo, y según los patrones de bandas observados en los distintos sistemas en los que se ha expresado la proteína, un autoprocésamiento a un pH distinto al pH ácido aseguraría su inactivación, ya que no se darían las condiciones específicas para realizar su función protegiendo al parásito y a la célula hospedadora.



## **VI.5 LOCALIZACIÓN DE LYT1**

En general, las proteínas se pueden dividir en dos clases de acuerdo a su localización final en la célula: aquellas que están asociadas con membranas y las que no. Cada clase de las anteriores se subdivide a su vez dependiendo de si la proteína se asocia con una estructura particular en el citosol o a un tipo de membrana. Los organismos eucariotas determinan el destino de sus proteínas dependiendo de la presencia o ausencia de determinadas señales que serán reconocidas por los sistemas de transporte específicos.

El fraccionamiento celular parcial de los distintos estadios (epis-, amas-, tripomastigotes y metacíclicos) de los parásitos salvajes, permitió observar que ambas formas de la proteína LYT1 se localizaban en la fracción de membranas, que incluía la membrana plasmática, núcleo y mitocondria. Utilizando los parásitos transfectados diferencialmente con cada forma de la proteína, se repitió el experimento, llevando a cabo en esta ocasión un fraccionamiento subcelular más completo que condujo a la observación de la forma completa de la proteína en la membrana plasmática y la forma sin la secuencia predicha como secuencia señal, en el núcleo. De igual modo, leishmanias transfectadas con la forma completa de la proteína mostraron una localización en la fracción de membranas, al igual que ocurrió con phytomonas transfectadas con la forma LYT1 completa. No se detectó nada cuando se realizó una incubación con anti-LYT1Ct con los sobrenadantes condicionados a pH neutro y pH ácido de los parásitos salvajes o de los mutantes nulos, phytomonas y leishmanias transfectadas con la forma completa de LYT1.

La inmunolocalización de la proteína en parásitos salvajes reveló su presencia (aunque de una forma muy tenue, debido probablemente al bajo nivel de expresión de la misma en epimastigotes) en el núcleo y flagelo. En los parásitos sobreexpresando sólo la forma completa de la proteína, ésta aparecía marcadamente en la membrana plasmática, rodeando al parásito. En los parásitos transfectados con la forma truncada de LYT1, en la que están ausentes los primeros 28 aminoácidos, la señal se observó en el núcleo y flagelo. En leishmanias transfectadas con la forma completa de la proteína, pero en las que parece que ocurre el mismo proceso de “*splicing*” alternativo que en *T. cruzi*, como se observa en el *western blot* de la figura V.41, la inmunolocalización detectó la proteína en la membrana y el citosol de los parásitos. En el caso de *P. Serpens*, donde la expresión de la forma completa



de LYT1 parece única, la presencia de la proteína se observó únicamente en la membrana plasmática.

Utilizando programas de predicción de señales de secreción (PSSIGNAL, PSORT <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) y de sitios específicos para la localización de las proteínas en las células (PSORT <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>, MitoProt <http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter>), se intentó determinar el destino final de ambas formas de la proteína LYT1. Utilizando el programa PSSIGNAL (PCGENE) se observó en LYT1 la existencia de un posible péptido señal de unos 15 aminoácidos, que indicaba que la proteína podía ser potencialmente secretada. Por otro lado, utilizando PSORT y MitoProt, se determinó la existencia de diferentes dominios de señalización en la proteína relacionados con posibles localizaciones en el parásito. Como se observa en la figura V.9, estos programas señalaron la existencia de motivos de retención en la membrana del retículo endoplasmático (**RKAA**, desde el aminoácido 2 al 5 de la zona aminoterminal), de exporte hacia la mitocondria (secuencia **CRGAAI**, empezando en el aminoácido en posición 22 desde el extremo aminoterminal al 27), y de exporte hacia el núcleo (**PKQRVLQ**, desde la posición 126 a la 132; **PAAKPRK**, desde el aminoácido 404 al 410).

Los resultados obtenidos indicaban que la forma completa de la proteína LYT1 no es secretada, sino que se encuentra asociada a la membrana plasmática. Las proteínas asociadas con las membranas usan una jerarquía de señales para encontrar su localización final. En el inicio de la secuencia de LYT1 nos encontramos con un motivo de exporte hacia el retículo endoplasmático (RE). En el RE las proteínas se mueven hacia sus destinos finales. Son glicosiladas y plegadas hacia sus conformaciones finales. Además, el RE proporciona un sistema de calidad en el que las proteínas incorrectas son identificadas y degradadas. Por defecto, si una proteína entra en el RE se dirigirá hasta la membrana plasmática [Munro, 2002]. En principio, la vía por la que las proteínas se insertan en la membrana sigue la misma ruta inicial que las proteínas secretadas, confiando en una secuencia señal que funciona al mismo tiempo que la traducción. Las señales en las proteínas que dirigen los ribosomas al retículo vienen determinadas por una secuencia de unos 20 aminoácidos próximos al extremo aminoterminal de la cadena polipeptídica naciente [Sabatini y col., 1982] y que normalmente no se encuentran en las proteínas secretadas ya que han sido eliminadas por una peptidasa señal situada en la cara luminal de la membrana del RE.



Aunque no resulta una secuencia consenso bien definida como la secuencia TATA de inicio de transcripción en eucariotas superiores, las secuencias señal presentan una serie de aspectos comunes tales como que los márgenes de longitud oscilan entre 13 y 36 residuos aminoacídicos, la parte aminoterminal de la señal contiene al menos un residuo positivamente cargado y poseen un tramo muy hidrofóbico (ala, leu, val, ile, phe) de unos 10-15 residuos que constituyen el centro de la secuencia. El punto de escisión suele estar flanqueado en la posición -3 por una alanina, cisteína, treonina, serina o glicina.

Los aminoácidos que constituyen la hipotética secuencia señal de LYT1 cumplen con la mayor parte de los requisitos de las señales eucarióticas. La predicción con el programa PSSIGNAL indica que el péptido señal está constituido por 15 aminoácidos siendo la posición -3 del punto teórico de escisión una alanina. En su parte aminoterminal posee tres cargas positivas (RKK) y un tramo hidrofóbico compuesto por 6 alaninas y 1 valina. Sin embargo, las proteínas que se quedan en la membrana poseen una señal de parada de la transferencia. Se trata de un conjunto de aminoácidos hidrofóbicos adyacentes a algunos residuos iónicos. Este conjunto de aminoácidos actúan como un anclaje sobre la membrana y para el proceso de translocación de la proteína a través de ella [Lewin, 2000]. En LYT1 encontramos esa estructura en el extremo amino terminal. Se ha descrito que existe una importante relación entre la secuencia señal que dirige a las proteínas hacia la membrana para ser secretadas y la secuencia de anclaje que las retiene en ella. Esta relación se basa en que en los dos casos se trata de una secuencia de unos 15-30 aminoácidos aminoterminal. En el extremo amino o muy cerca hay bastantes residuos polares, y dentro de la secuencia hay un centro hidrofóbico. De hecho, las señales de anclaje pueden funcionar como secuencias de secreción cuando se encuentran en localizaciones diferentes o si se hallan en proteínas que han perdido otras señales [Lewin, 2000]. Por esta razón, en un principio se pensó que la secuencia aminoterminal de LYT1 correspondía a una secuencia para la secreción de la proteína. La secuencia de anclaje se encuentra en LYT1 combinada con la secuencia señal de exporte hacia la membrana. Esta disposición es típica de las proteínas del grupo II. Las proteínas que tienen un solo dominio transmembrana caen dentro de dos clases principales. Mientras que en las proteínas del grupo I el extremo aminoterminal se encuentra hacia el exterior celular, en las del grupo II se enfrenta al citoplasma. La orientación se determina durante la inserción de la proteína en el retículo endoplasmático. Cuando existe la secuencia de anclaje, la inserción en la membrana comienza por la inserción de la secuencia señal en



forma de bucle, quedando el extremo aminoterminal hacia el citosol. En las proteínas del tipo I, la secuencia señal y la de anclaje, cuando existe, están bastante separadas, de forma que una gran parte de la proteína pasa a través de la membrana quedando un poco del extremo C-terminal en el lado citosólico. Las proteínas del grupo II tienen la secuencia señal combinada con la secuencia de anclaje, y el extremo N-terminal es el que queda en el citosol [Lewin, 2000]. En las proteínas del grupo II, la estructura de la secuencia señal unida a la secuencia de anclaje recuerda a la secuencia de secreción (como ocurre en LYT1) El lado de la secuencia cercana a la secuencia de anclaje con más cargas positivas se localiza en el citoplasma, que serían los aminoácidos RKK del inicio del extremo aminoterminal.

Una proteína integral de membrana requiere la interrupción de la bicapa lipídica. Una característica común de este tipo de proteínas es la presencia de, al menos, una región transmembrana, que consiste en una estructura estrecha en  $\alpha$ -hélice de 21-26 aminoácidos hidrofóbicos. Cuando se utilizó el programa de predicción de regiones transmembrana TMHMM, éste la identificó como una proteína soluble. Resulta que los péptidos señal que determinan la exportación de una proteína contienen una región hidrofóbica que puede provocar errores para determinar una región transmembrana a través de un programa de predicción de estas estructuras. En las proteínas, las regiones de membrana forman una lámina B. Aunque sus regiones transmembrana son más cortas y mucho menos hidrofóbicas que las de las proteínas de membrana helical, podrían ser una fuente de hélices transmembrana falsamente predichas. El programa TMHMM no identifica a las porinas como proteínas integrales de membrana [Krogh y col., 2001 #852]

Una secuencia que cumple el criterio para la inserción en las membranas puede ser identificada por una curva de hidropatía, que mide la hidrofobicidad acumulada de un conjunto de aas [Rawn, 1989]. Tras el análisis de hidrofobicidad de LYT1 se observó la existencia de una región que cumplía los requisitos para la inserción de la proteína en la membrana. Una proteína que tiene sus dominios expuestos en ambos lados de la membrana es una proteína transmembrana. Cuando hay un solo dominio transmembrana, su posición determina que cantidad de la proteína está expuesta a cada lado. La longitud de los extremos amino y carboxiterminal puede ser bastante variable.

Con todo lo dicho parece que la forma completa de LYT1 es una proteína de membrana del grupo II, que presenta el extremo amino en contacto con el citosol, y el extremo carboxilo en contacto con el medio extracelular. En relación a esto, se han descrito en *T. cruzi* y



*Leishmania sp* enzimas secretadas o ectoenzimas con actividad kinasa o fosfatasa que parecen estar implicadas en diferenciación celular e invasión a través de redes de señalización [Rodríguez y col., 1999]. Así, a través de este extremo carboxilo LYT1 podría entrar en contacto con la membrana de la vacuola fagolisosómica y actuar directamente sobre su permeabilidad y/o disparar algún tipo de señal intracelular que condujese a la liberación de otros factores implicados en la formación del poro como TcTOX. El hecho de que la zona amino esté más conservada y la zona carboxilo sea más variable tiene sentido en este contexto, donde la zona amino estaría implicada en procesos de señalización intracelulares bien conservados, y la zona carboxilo tendría que interactuar con variedad de moléculas correspondientes a los distintos tipos celulares que pueden ser invadidos por el parásito, pudiendo ser seleccionadas las distintas modificaciones que puede sufrir esta zona en función de su éxito en la infección.

Respecto a la forma de LYT1 sin los primeros 28 aminoácidos, parece que la localización es eminentemente nuclear. Todas las proteínas se sintetizan en el citosol, por lo que las proteínas requeridas en el núcleo deben transportarse allí. Las proteínas de más de 50 KDa, no entran en el núcleo por difusión pasiva, sino que requieren un transporte activo. Existen diferentes señales para la importación de proteínas hacia el núcleo. El motivo más común es el llamado señal de localización nuclear (NLS). No existe una conservación aparente entre la secuencia de las diferentes señales NLS, quizás sean importantes la forma de la región o su basicidad. Tienen en común su corta longitud (de 7-9 aminoácidos generalmente básicos) y que se localizan en el interior de la secuencia. Frecuentemente hay un residuo de prolina que rompe la formación de la  $\alpha$ -hélice corriente arriba de los residuos básicos. Los motivos descritos como NLS en LYT1 cumplen todos los requisitos para ser consideradas verdaderas señales de localización nuclear.

El hecho de que una misma molécula de RNAm esté originando proteínas con distinta localización al mismo tiempo (ya que ambas formas de LYT1 se producen en todos los estadios), lo que implicaría que la localización del procesamiento fuera diferente, y que tuvieran que existir diferentes señales que dirigieran el RNAm hacia un sitio u otro se plantea como un hecho bastante complejo. Sin embargo, descubrimientos recientes acerca del proceso de traducción parecen resolver este problema, constituyendo LYT1 un buen ejemplo del mecanismo postulado.





Los eucariotas y procariotas pueden dirigir las proteínas bien hacia determinados orgánulos o bien hacia el exterior celular. En los eucariotas, la decisión se adopta poco después de iniciarse la síntesis de proteínas, de modo que los ribosomas permanecen libres en el citosol, donde sintetizan las proteínas citosólicas o de localización nuclear, a menos que se vean dirigidos hacia el RE por la secuencia señal de la proteína que se está sintetizando. El péptido señal es reconocido por una ribonucleoproteína denominada partícula de reconocimiento de señales (SRP) [Walter y col., 1984], que se une sólo a los ribosomas que contienen cadenas nacientes con señal de reconocimiento, y el complejo ribosoma-SRP se dirige a la membrana del RE donde se une al receptor del SRP. El modelo actual propone que los ribosomas ligados al RE están asociados con el translocon, conjunto de componentes que participan en la translocación de la proteína para dirigir la transferencia y la integración en la membrana del RE del polipéptido en formación. Desde este punto de vista, los ribosomas ligados al RE participan solamente en la traducción de las proteínas secretadas, integrales, y presentes en el espacio luminal o membrana del RE [Nichitta, 2002]. Las cadenas polipeptídicas nacientes de esos ribosomas unidos a membrana se translocan a través de la membrana del RE, posteriormente en el lumen del RE y complejo de Golgi, donde muchas proteínas sufren distintas modificaciones postraduccionales. Posteriormente se distribuyen para ser liberadas en los lisosomas, vesículas de secreción o membrana plasmática. Investigaciones recientes han sugerido que los ribosomas ligados al RE pueden también participar en la síntesis de proteínas citosólicas [Nichitta, 2002]. Se ha visto que los ribosomas unidos a la membrana del RE son capaces de iniciar la síntesis proteica *de novo* desde el RE al que se encuentran unidos [Potter y Nichitta., 2000]. Cuando ribosomas unidos a la membrana del RE están en contacto con RNAm que codifican proteínas citoplasmáticas, la cadena proteica en formación es liberada desde el RE al citosol [Potter y Nichitta., 2000; Potter y col., 2001]. Con este modelo se ha propuesto que el RE es el sitio primario de localización del RNAm en la célula y una plataforma para la compartimentalización de la síntesis proteica. Los requerimientos biológicos de que exista esta localización del RNAm no están claros. Se podría especular que los productos de traducción de esta subclase de RNAm podrían contribuir a funciones tales como el plegado de proteínas de membrana y/o la identificación y procesamiento de proteínas de membrana mal plegadas, señales de transducción desde el RE, la regulación del tráfico proteico hacia el núcleo. En este sentido, es interesante el hecho de que en levaduras, el RNAm *HAC1*, que



codifica un factor de transcripción soluble, esté altamente enriquecido en ribosomas ligados a la membrana del RE [Diehn y col., 2000]. Quizás, localizando la síntesis de éste u otros factores de transcripción en la superficie del RE, se cree un escenario en el que podría ocurrir la transferencia al núcleo de forma regulada y altamente eficiente, de forma similar a cómo la organización superordenada de las enzimas metabólicas proporciona ventajas cinéticas del transporte del sustrato.

La forma truncada de LYT1 se propone, a través de los resultados de esta tesis, como un posible factor de transcripción o elemento regulador de un proceso de señalización, ya que se ha comprobado su participación en los procesos relacionados con el cambio de estadio del parásito. En este contexto, se propone que LYT1 podría ser producida en sus dos formas a partir de ribosomas ligados directamente a la membrana del RE. Una de las formas continuaría hacia la membrana plasmática, mientras que la otra forma de LYT1 se dirigiría hacia el núcleo o podría actuar directamente en un proceso de señalización desde el RE, aprovechándose de las ventajas que este sistema presenta para la óptima actividad proteica.

Por otro lado, se ha podido observar el hecho de que aparezca también una señal en el flagelo. Esto podría deberse a un fenómeno de reactividad cruzada con el anticuerpo de otras proteínas relacionadas con LYT1, como se comentó anteriormente que era común entre las proteínas formadoras de poros. Sin embargo, el que no aparezca esa señal de reconocimiento en los parásitos expresando sólo la forma completa de LYT1 (tanto en *T. cruzi* como en *P. serpens* transfectados con pTEXble-LYT1), unido a la observación de que en los parásitos transfectados con la forma truncada de LYT1, aparece además de la banda de 56.7 KDa, otra de 52 KDa, aproximadamente, que también estaba presente en los lisados de *L. tropica*, (donde parece que se pueden producir las dos formas de la proteína) nos llevó a deducir que parece existir una forma de la proteína que parece producirse a partir de la forma truncada. La aparición de esta banda había pasado inadvertida en la detección por *Western blot* de los parásitos salvajes debido a que su presencia es muy tenue. Sin embargo, esta nueva forma de la proteína podría ser simplemente un producto de degradación de la forma truncada de LYT1, que aparece sólo cuando esta forma es expresada (esto es en los parásitos salvajes, en los transfectados con LYT1 $\delta$ atg, y en leishmanias). Precisamente sólo en estos organismos aparece esa doble localización. Se han descrito otros casos en los que existe diferente localización entre dos formas casi idénticas de una proteína. La proteína KMP11, relacionada con la supervivencia de *L. donovani* en el fagolisosoma, aparece localizada en la



membrana plasmática. Pero en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. infantum*, donde la proteína pierde una Arginina en posición 45 y se modifica por N-metilación, se asocia con el flagelo y el bolsillo flagelar. El hecho de que esté asociada con microtúbulos del citoesqueleto parece ser importante para el hecho de que exista una controversia acerca de su localización subcelular en las diferentes especies [Thomas y col., 2000]. Ya que LYT1 completa se asocia con la membrana, es lógico pensar en su asociación con el citoesqueleto del parásito y en el hecho de que la forma derivada de la forma truncada de LYT1 pueda seguir manteniendo esa asociación, y que las modificaciones presentes en su estructura impliquen su localización en el flagelo. Otro caso es el de las proteínas de *Toxoplasma gondii* MyoB y MyoC. Ambas son codificadas por 1 gen y dan lugar a dos RNAm que codifican dos miosinas con diferentes colas, que determinan su localización y su función. MyoB es menor que MyoC, es como si fuera el producto de un procesamiento incompleto del transcrito primario. MyoB se localiza en citoplasma, y MyoC con los polos anterior y posterior de [Delbac y Soldati., 2001]. También se ha descrito diferente localización de la misma proteína dependiendo de la fase de crecimiento del parásito. Así, utilizando epimastigotes en fase de crecimiento logarítmica, la localización fue en el citoplasma y el núcleo, mientras que cuando se dejó que los parásitos progresaran hasta la fase estacionaria el marcaje fue predominantemente nuclear [Ouaissi y col., 2000]. Esta observación indica que en cualquiera de los casos no ocurre una localización al 100% sino que ocurre algo intermedio. Esto quiere decir que, en función de las señales de localización presentes en la proteína LYT1, en el caso de que se produjera la forma de la proteína completa, parte podría localizarse en el citosol. En el caso de que se produzca la forma sin péptido líder, podría ocurrir algo parecido de forma que la proteína no se localice totalmente en el citosol o se va al núcleo, sino que será algo intermedio. El hecho de que todos los parásitos utilizados en los diferentes análisis de localización de la proteína se encontraran en la fase semilogarítmica podría quizás explicar de una forma sencilla la diferente localización observada de la forma truncada de la proteína.

Todos estos datos en conjunto nos permiten concluir que las dos formas de LYT1 tienen una localización diferencial, de modo que la forma completa de la proteína se localiza en la membrana y la forma truncada se localiza en el núcleo. Las dos formas de LYT1 poseen los elementos necesarios en su estructura primaria para dirigir su localización final, ya sea a la membrana plasmática o núcleo, y, de alguna manera este proceso es dependiente de estadio,



ya que es éste el que determina que forma de la proteína es expresada mayoritariamente a través de un proceso de “*splicing*” alternativo.



## **VI.6 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LYT1**

El papel central que LYT1 parece desempeñar en el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* se demuestra con los fenotipos que presentan los mutantes nulos: una actividad hemolítica disminuida, infectividad deficiente, y desarrollo del cambio de estadio acelerado.

### **VI.6.1 Actividad lítica de la proteína LYT1**

En el trabajo anterior llevado a cabo en nuestro laboratorio por la Dra. A. Cortés, se describió que, epimastigotes y metacíclicos mutantes nulos, poseían una actividad hemolítica a pH ácido inferior a la de la cepa salvaje. Este resultado demostraba que la eliminación del gen *LYT1* del genoma del parásito originaba una pérdida de actividad lítica indicando que LYT1 estaba involucrado en este proceso. Además, la evidencia directa de que LYT1 posee actividad lítica a pH 5.5 fue proporcionada al analizar extractos de levadura transformados con el gen que codifica LYT1.

Basándonos en los resultados obtenidos en esta tesis acerca de la existencia de un proceso de “*splicing*” alternativo que origina dos formas de la proteína, se planteó la posibilidad de que este proceso estuviera asociado a una de las formas anteriores. Como se muestra en la figura V.36, parásitos mutantes nulos transformados con la forma completa de la proteína presentaban niveles de actividad hemolítica incluso superiores a los que presentaban los parásitos de la línea salvaje (probablemente debido a la sobreexpresión de esta forma de la proteína, respecto a sus niveles de expresión normales en los parásitos salvajes). Sin embargo, los mutantes nulos transfectados con la forma de la proteína que no tiene los primeros 28 aminoácidos, presentaron niveles de hemólisis inferiores a los anteriores y similares a los de los mutantes nulos. Utilizando otros sistemas de expresión de la forma completa de la proteína, como fueron *L.tropica* (transfectados con px63NEOLYT1, figura V.43) y *P.serpens* (transfectados con pTEXble-LYT1, figura V.48), se observó también cierta actividad lítica que no aparecía en los parásitos transfectados solo con los vectores respectivos en cada caso. Aunque LYT1 es expresada por *L.tropica* transformada con px63NEO-LYT1 a pH neutro, no se detectó actividad lítica cuando se incubaron los parásitos con eritrocitos a ese pH. El requerimiento del pH ácido para la actividad podría ser



explicado sobre la base de a este pH tienen lugar cambios conformacionales en el polipéptido (comentados anteriormente), como en el caso de la toxina de la difteria. Este resultado, junto con la actividad hemolítica de levaduras a pH 5.5 y de *P.serpens*, cuyo desarrollo ocurre a pH ácido, confirmó la importancia del pH en la actividad de cada forma de la proteína. El hecho de que apareciese cierta hemólisis en *Phytomonas* transfectadas solo con el vector, cuando no se ha descrito ninguna actividad PFP en esta especie, podría deberse al efecto mecánico producido por el movimiento activo de estos parásitos (mayor que en los otros casos debido a que su pH fisiológico es el utilizado en los experimentos), ya que no se puede separar ese efecto del efecto específico producido por moléculas formadoras de poros en estos experimentos. También podría ser que el parásito poseyera algún tipo de molécula, aún no descrita que provocase de manera indirecta ese fondo de hemólisis. Por otro lado, en sobrenadantes condicionados a pH ácido de leishmanias transfectadas con LYT1 también se observó una importante actividad lítica. El hecho de que la proteína no hubiera sido detectada en los sobrenadantes utilizando un reconocimiento inmunológico, sugirió diversas hipótesis. Podía ocurrir que *Leishmania* fuese capaz de secretar LYT1, ya que ha sido descrito que, aún conociendo muy poco acerca de la vía secretoria de proteínas o de señales necesarias para la secreción proteica en kinetoplastidos, parece que los requerimientos para el corte en la secuencia señal de las proteínas secretadas son diferentes para *T. cruzi* y mamíferos e incluso varían con otros miembros de la familia kinetoplastida [La Flamme y col., 1995]. De hecho la propia PFP de *Leishmania*, denominada leishporina no existe libremente en el citosol. Co-sedimenta con la fracción de membrana pero parece estar atrapada dentro de vesículas membranosas en una forma soluble. Los promastigotes no secretan la forma soluble [Horta, 1997]. En los experimentos llevados a cabo con *L. tropica* se utilizaron promastigotes. Sin embargo, podía ser que, al estar sobreexpresando la proteína LYT1, parte de ésta fuera secretada. De cualquier modo puede que, bien por la propia vía de secreción utilizada, bien por el método de concentración del sobrenadante, hubiese cantidad de proteína suficiente para que ocurriese cierta hemólisis pero no para su inmunodetección específica.

Todos estos resultados sugirieron que la actividad hemolítica asociada con LYT1 era debida a la forma completa de la proteína, localizada en la membrana plasmática de los parásitos.



### VI.6.2 Actividad biológica de LYT1 en el proceso de infección celular

La implicación de LYT1 en el proceso de infección fue demostrada al comprobar en los ensayos de infección de células LLCMK2 por parásitos metacíclicos mutantes nulos, una disminución en la producción de tripomastigotes respecto al control [Cortés, A., tesis doctoral, 1998]. Conociendo que la capacidad invasiva de los mutantes y la cepa salvaje era similar y observando un pequeña proporción de parásitos mutantes nulos en el sobrenadante en el curso de las infecciones, se planteó la posibilidad de que el efecto en la infección generada a través de LYT1 ocurría en algún momento posterior a la invasión, es decir, que LYT1 estuviera actuando a nivel de la salida de los parásitos al citosol y ruptura de la vacuola fagolisosómica. La implicación de LYT1 en la infección se estudió a través de las infecciones secundarias y de los experimentos de inmunofluorescencia.. En primer lugar (figura V.26 A y B) parece que se crea un retraso en el curso de la infección por parte de la cepa mutante respecto a la salvaje, pero, que a pesar de todo, existe una población de parásitos de la cepa mutante que escapa de la vacuola, se divide en el citoplasma, y origina nuevas formas infectivas. Han sido descritos varios estudios sobre la infección de *T. cruzi* en los que, realizando experimentos concretos dirigidos a inhibir la infección, no se ha alcanzado una inhibición completa. Por ejemplo, se ha descrito que aumentos en el pH de los compartimentos ácidos inhiben el escape del parásito al citosol [Ley y col., 1990]. Las diferentes drogas utilizadas en ese experimento causaron una reducción del 52 al 91% en el número de parásitos liberados de la vacuola, pero en ningún caso se obtuvo una inhibición total. La transialidasa y el ácido siálico juegan un papel fundamental en el proceso de invasión, sin embargo, ni la utilización de células deficientes en ácido siálico terminal ni el uso de azúcares compitiendo específicamente con la transialidasa han logrado un 100% de inhibición de la invasión [Ming y col., 1993; Schenkman y Eichinger., 1993c]. La utilización de mecanismos alternativos como glicosaminoglicanos de la superficie de la célula huésped y la penetrina del parásito [Ortega-Barria y Pereira., 1991] podrían explicar el porcentaje de invasión observado. Otro caso es el que ocurre cuando se utiliza una proporción de parásitos que son deficientes en la enzima transialidasa (TS), fundamental en el proceso infectivo transfiriendo residuos de ácido siálico desde la célula hospedadora al parásito. Los parásitos TS-, no son infectivos. Sin embargo, cuando se infecta con una población TS+, se vuelve a obtener la misma proporción de la población TS- [Pereira y col.,



1996]. En nuestro caso, lo que se utilizan son parásitos LYT1-, obteniéndose una población de parásitos en los que se desconocía si podían o no ser LYT1+. La proporción de mutantes nulos que sigue un proceso infeccioso normal puede deberse a varias posibilidades. Por ejemplo, puede que cierta población de los mutantes estén activando rutas alternativas de salida de la vacuola para completar su ciclo de vida. Esto sería bastante comprensible, ya que no sería lógico que toda una ruta implicada en un proceso tan importante en el ciclo de vida del parásito (como es la salida al citosol, que le permitirá replicarse y continuar con la infección) fuese dependiente de una sola proteína o ruta de señalización. Pero también podría ser que la célula se rompiera de forma física debido a la carga parasitaria, ya que parece que en las infecciones producidas por los mutantes nulos, llegan a verse células con el citoplasma enorme y llenas de amastigotes (algo que no se observa en la cepa salvaje, donde los amastigotes se replican e inmediatamente viran a tripomastigotes). Por tanto, es posible que el pequeño porcentaje de infección productiva producida por los mutantes nulos se deba a una rotura física de la membrana fagolisosomal debida a la movilidad del parásito, que liberaría su contenido al citosol. Allí, los amas mutantes podrían terminar de virar a tripomastigotes o incluso infectar otras células como tales amastigotes. O bien a un estado metabólico de la célula no óptimo que favorecería el proceso de infección. También podría ocurrir que, de alguna forma, estuviera revirtiendo el fenotipo de los mutantes nulos. Por lo tanto, para seguir caracterizando las implicaciones de LYT1 en el ciclo de vida del parásito, era necesario saber que ocurriría con las infecciones inmediatas con la primera progenie de tripos liberados en las infecciones realizadas con las cepas mutantes. Había que comprobar si en las nuevas infecciones se producía una salida de la vacuola en una determinada y menor proporción que lo que ocurría en la cepa salvaje, o si la nueva población de parásitos, que ha logrado escapar de la vacuola se comporta como la cepa salvaje, no hallándose diferencias entre la cepa salvaje y los mutantes en las proporciones de parásitos que escapan de la vacuola. Para comprobar estas posibilidades, se realizó en primer lugar un análisis por PCR de los tripomastigotes obtenidos a partir de una infección primaria realizada con epimastigotes en fase semilogarítmica. Utilizando cebadores específicos del gen *LYT1* se confirmó la ausencia del mismo de los mutantes nulos, descartando la posibilidad de que estemos trabajando con una población heterogénea de parásitos. A continuación se llevaron a cabo infecciones con esa primera generación de tripomastigotes obtenida en la infección normal. El resultado (figuras V.26 C y D) parece señalar que la salida de tripos en estas





infecciones secundarias, repitiendo el patrón de salida de la primera infección, no se debe a una ruta lítica alternativa, ya que los mutantes no llegan a comportarse como la cepa salvaje. Sin embargo, podría ser que esta ruta tuviese lugar, pero al ser una vía secundaria no siempre tuviera éxito, y de ahí que no se produzca el 100% de éxito en la infección llevada a cabo por los mutantes nulos. También podría deberse a procesos mecánicos sobre las células. Considerando la movilidad y el gran tamaño del parásito y el reducido espacio vacuolar, se podría esperar que, en ocasiones, se produzca una rotura física de la membrana fagolisosomal. Por otro lado, podría ser que *LYT1* no fuese totalmente imprescindible para la formación del poro, y que la rotura de la vacuola pudiera tener lugar por otros elementos que participaran junto a esta proteína.

En estos experimentos se utilizaron parásitos salvajes, mutantes simples que habían retenido una de las dos copias alélicas en el proceso de sustitución génica, y mutantes nulos, deficientes en *LYT1*. Tanto en las infecciones primarias como en las llevadas a cabo con los tripomastigotes de la primera generación, se observó que los mutantes simples mostraban un fenotipo intermedio respecto a los parásitos salvajes y los mutantes nulos, lo que parecía indicar que, realmente el fenotipo de infección deficiente observada en estas líneas es resultado de las deleciones de *LYT1*, y que existía un efecto de dosis génica, de modo que para una completa actividad de la proteína se requieren las dos copias alélicas.

Utilizando parásitos mutantes nulos transfectados con cada una de las formas derivadas de *LYT1*, se observó que aquellos expresando la forma completa de la proteína recuperaban la capacidad infectiva, siendo ésta incluso mayor que la de los parásitos salvajes, mientras que los mutantes nulos transfectados con la forma truncada de *LYT1* (sin los primeros 28 aminoácidos del extremo aminoterminal) mostraban el mismo fenotipo de infectividad disminuida que los mutantes nulos (figura V.38). Por lo tanto, la forma completa de *LYT1* está implicada en el proceso infectivo, en una fase relacionada probablemente con los acontecimientos líticos que originan la ruptura de la vacuola fagolisosomal.

La implicación de *LYT1* en el proceso infectivo se observó también en leishmanias y phytomonas transfectadas con la forma completa de la proteína.

En el caso de las infecciones de macrófagos con *L. tropica* se observó que las leishmanias transfectadas con *LYT1* exhibieron menor número de células infectadas y menor número de parásitos por célula que el control de parásitos transfectados sólo con el vector. Este hecho tenía mucho sentido e importancia a la hora de considerar la actividad de *LYT1* en el



contexto del ciclo de vida de *L. tropica*. En el intestino del insecto vector, *Leishmania* existe como promastigote. Durante su ciclo de crecimiento se transforman en una forma altamente infectiva, que es transmitida por la picadura. e internalizada por las células del sistema fagocítico mononuclear. En estas células, los promastigotes se transforman en amastigotes, que pueden vivir y mutiplicarse en el interior de la vacuola parasitófora, a pesar de su continua fusión con lisosomas. Una vez que es ingerido por los macrófagos, el parásito se disemina fácilmente por el sistema fagocítico mononuclear: la célula hospedadora se rompe liberando numerosos amastigotes que infectan los macrófagos circundantes [Noronha y col., 2000]. Los mecanismos de evasión de leishmania en la vacuola son: evasión de los componentes citotóxicos del suero, supervivencia dentro del macrófago, y modulación de la respuesta inmune de células T [Parasitología molecular]. En el proceso infectivo in vitro normal, se observa que tanto el número de células infectadas como el número de parásitos intracelulares disminuye con el paso del tiempo, probablemente debido a un desequilibrio a favor de los mecanismos de respuesta tóxica desarrollados por el macrófago en esas condiciones (que dependen de la multiplicidad de infección, del tiempo de exposición, etc). Lo que ocurre con las leishmanias transfectadas con LYT1 es que la infección disminuye pero de una forma mucho más rápida y adelantada en el tiempo a los valores obtenidos con las leishmanias control (figura V.44). Se ha descrito que, cuando el parásito es internalizado por el macrófago requiere un ambiente ácido para poder cambiar al estadio replicativo y continuar su ciclo de vida. Lo que parecía estar ocurriendo era que las leishmanias transfectadas con LYT1 al ser internalizadas y entrar en contacto con un ambiente ácido, sobreexpresaban la forma completa y activa de LYT1 originando la ruptura de la vacuola fagolisosómica mucho antes de que hubiese podido ocurrir el cambio de estadio a la forma amastigote, y dejando expuesto al parásito a los mecanismos efectores del macrófago frente a los que la forma promastigote no ha desarrollado mecanismos de evasión. Además, son las formas amastigotas de *Leishmania* las que llevan a cabo la ruptura de la membrana de la vacuola, protegiéndose de la propia lisis tal vez podría expresando proteínas de superficie protectoras (que podrían ser estadio-específicas), o el propio mecanismo de activación regulada de la leishporina podría ser una forma de protección [Almeida-Campos y Horta., 2000], con lo cual los promastigotes podrían no estar preparados y podrían sufrir el efecto de la activación de LYT1 a pH ácido. Por lo tanto, los parásitos eran eliminados por el macrófago o por autólisis, contabilizándose así menor número de células infectadas (células



con parásitos en su interior), que en los controles, así como una parada en los procesos de replicación de los parásitos.. El porcentaje que mantenía la infección podía deberse a que no toda la población transfectada de leishmanias utilizadas en las invasiones expresaba la proteína, habiendo adquirido, sin embargo, resistencia al antibiótico utilizado. Mientras que en las células infectadas con el control se observaban amastigotes replicándose, en las células infectadas con los parásitos transfectados con LYT1 parecían observarse amastigotes en el citosol (figura V.45). Sin embargo, análisis por microscopía electrónica deben ser realizados para comprobar realmente la liberación de las formas promastigotes al citosol y rotura de la vacuola fagolisosómica antes de la replicación del parásito como amastigotes. La tinción con giemsa solo permitió en algunos casos la observación de vacuolas, que casi siempre aparecían en las infecciones realizadas con los parásitos control. La capacidad hemolítica demostrada por las leishmanias transfectadas con LYT1, unido a la sobreexpresión de la proteína en el parásito, parecía indicar que las diferencias contabilizadas en este experimento de infección se debían a LYT1, y que su actividad estaba dirigida principalmente a la ruptura de la vacuola parasitófora.

Curiosamente cuando se utilizaron *Phytomonas* en el mismo experimento de infección de macrófagos, los resultados fueron opuestos, aunque el significado de la implicación de LYT1 se puede considerar el mismo. Así, en cuanto al porcentaje de células infectadas (contabilizadas como células con parásitos en el interior), éste fue mayor en los parásitos que expresaban LYT1. Respecto al número de parásitos por célula, los parásitos transfectados con la forma completa de la proteína parecían dividirse en dos poblaciones. Una de ellas, parecía tener la misma capacidad replicativa que los parásitos transfectados solo con el vector, mientras que la otra población aparecía bastante alejada en cuanto al número de parásitos intracelulares respecto a los parásitos control. Los parásitos del género *Phytomonas* han sido descritos como parásitos de plantas y hasta ahora no se había intentado una infección en células de mamíferos. Ha sido una gran sorpresa conocer la capacidad infectiva que muestran los parásitos control, llegando incluso a replicarse en el interior de la vacuola, como lo demuestra el hecho de que se encontraron células con hasta 4 parásitos. La capacidad de replicación de *Phytomonas* en el ambiente ácido de la vacuola no es de extrañar en cuanto a que su crecimiento y replicación ocurre en condiciones ácidas. Lo que no se sabía hasta ahora era la capacidad del parásito para soportar los mecanismos de defensa de un organismo animal, sobre todo al principio de la infección, ya que a las 96 horas, el



proceso infectivo empieza a ser controlado por el macrófago. LYT1 supuso un incremento enorme en ambas capacidades de infección de los parásitos, llegando a obtenerse hasta un 60% de células infectadas y hasta 7 parásitos por célula. Además, mientras que en los macrófagos infectados con los controles, éstos se observaban claramente en el interior de vacuolas, los parásitos sobreexpresando LYT1 se observaron en gran número en el citoplasma celular. No se conocen los mecanismos subyacentes a la capacidad de *Phytomonas* para soportar un ambiente hostil con el que no ha estado nunca en contacto, por lo que se requiere una amplia investigación en este campo. Lo que si parece estar claro en estos experimentos es que la sobreexpresión de LYT1 acentúa el fenotipo de infectividad de estos parásitos, lo que unido a la actividad hemolítica que demuestran parece indicar que es el escape de la vacuola lo que permite el éxito de la infección, en este caso (al contrario que en *Leishmania*). Así, la salida temprana de la vacuola permite evitar el contacto agresivo con todo el arsenal de defensa expuesto por el macrófago y produce que haya más células infectadas (ya que los parásitos control seguramente sean degradados en su mayoría, en la vacuola), y, al tener *Phytomonas* capacidad replicativa a pH neutro, incrementar rápidamente el número de parásitos en el interior celular. También parece que no existe el efecto de autólisis producido por LYT1 sobre el parásito (como se describió anteriormente en *Leishmania*), ya que las condiciones de acidez en el macrófago son las mismas que se mantienen en el cultivo axénico del parásito, donde éste crece con normalidad. La población que se comporta como los controles parece responder al hecho de haber sido seleccionados por alguna forma de resistencia al antibiótico utilizado pero sin expresar la proteína. De hecho, se han descrito que ocurren reordenamientos de la secuencia del vector pTEX hasta en un 15% de los epimastigotes transfectados, lo que puede contribuir a que no exista una uniformidad fenotípica en los cultivos [Norris, 1998]. También se ha observado que cuando se estudia la expresión transiente de un gen reporter en distintas poblaciones de *T. cruzi*, se observa una enorme variabilidad. Diferentes stocks del parásito muestran distinta capacidad para expresar genes introducidos exógenamente. Es importante tener en cuenta este hecho cuando se hacen experimentos en los que se transforman parásitos con la intención de identificar genes capaces de conferir distintos fenotipos a diferentes stocks [Laurent y Swindle., 1999]. De esta forma se podría explicar la variabilidad observada el caso de *Phytomonas*.



### VI.6.3 Escape del parásito de la vacuola fagolisosómica

Tras la entrada del tripomastigote en la célula hospedadora, éste queda incluido en una vacuola fagolisosómica de la que escapa poco tiempo después para replicarse libremente en el citosol. En este sentido se planteó un experimento de infección con la hipótesis de trabajo basada en que una posible diferencia entre los mutantes nulos y los parásitos salvajes podría encontrarse en el tiempo de salida al citosol de ambas cepas (ya que se comprobó que la capacidad de invasión era similar). Puesto que en la cepa mutante no existe el producto del gen LYT1, es de suponer que podríamos encontrar la mayoría de los parásitos en el interior de vacuolas a un tiempo dado, mientras que en la cepa salvaje la mayoría se encontraría en el citosol, o fuera de las células. A través de experimentos de infección que permitían cuantificar la localización celular (citoplasma, vacuola, exterior celular) de los parásitos salvajes y mutantes nulos a lo largo del tiempo, se observó que, entre 4 y 6 horas posteriores a la infección mientras que la mayor proporción de los parásitos salvajes se localizan en el citoplasma, la mayoría de los mutantes estaban retenidos en la vacuola fagolisosómica. Es decir, parece que se crea un retraso en el curso de la infección por parte de la cepa mutante respecto a la salvaje, pero, que a pesar de todo, existe una población de parásitos de la cepa mutante que escapa de la vacuola, se divide en el citoplasma, y origina nuevas formas infectivas. En el caso de los parásitos transfectados de manera independiente con cada forma de la proteína LYT1, se observó que los parásitos expresando LYT1 mostraban parásitos en el citosol desde las 2 horas posteriores a la infección, mientras que los que expresaban la forma truncada de la proteína se comportaban como los mutantes nulos. Además, el número de parásitos intracelulares era bastante alto desde un principio en los parásitos expresando la forma completa de la proteína, lo cual tenía sentido si la salida de la vacuola ocurría tan rápidamente. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, todo parece señalar a que la forma completa de la proteína LYT1 está asociada a una actividad hemolítica, que es requerida para la lisis de la vacuola parasitófora, lo que no ocurre en los parásitos mutantes nulos, quedando retenidos en ella, y bloqueado el proceso infectivo.

Andrews y Whitlow postularon en 1989 que TcTOX participaba en la ruptura de la membrana vacuolar, cuando es secretada en el fagosoma ácido, por formación de poros, pero aunque TcTOX fue localizada en el interior del fagolisosoma no se demostró de forma directa su inserción en la membrana. Un estudio llevado a cabo para evaluar el tamaño de las



lesiones que los amastigotes causan en las membranas, indicó que eran de un diámetro aproximado de 10 nm [Andrews y Whitlow., 1989]. Posteriormente, experimentos realizados en bicapas lipídicas mostraron que fracciones enriquecidas en TcTOX inducen pasos de conductancia característicos de canales iónicos transmembrana a pH ácido de diámetro mucho menor a 10 nm [Andrews y col., 1990]. Estas diferencias podrían explicarse por la formación de lesiones transmembrana mayores a más largo plazo. No obstante, cabe la posibilidad de que a pesar de que TcTOX por si sola sea capaz de generar pequeños canales, las grandes lesiones originadas por amastigotes estén provocadas por más de una proteína. De manera análoga al sistema del complemento humano que requiere la unión de C5, C6, C7 y C8 para formar el complejo C5b-8 que, anclado en la membrana, une una molécula de C9 que induce la oligomerización de otras 20 moléculas generando grandes poros. Sin embargo, en sistemas artificiales formados por liposomas y  $Zn^{2+}$  se puede prescindir de C5b-8 para generar poros, siendo la unión de varias moléculas de C9 suficientes para generar canales de estructura cilíndrica y heterogénea. La actividad conjunta de proteínas para la formación final de poros en las membranas se ha descrito también para el caso de *Leishmania*. Parece que puede haber otras proteínas como gp63, que está unida a la membrana por GPI, que pudieran intervenir en la formación de poros. Se postula que los poros formados por la leishporina se deben a agregación de subunidades y que la formación del poro ocurre en dos pasos: unión de la citolisina a la membrana de forma independiente de la temperatura, inserción y polimerización de las subunidades dependiente de temperatura. [Noroña y col., 2000]. La implicación directa de LYT1 en la formación de poros en la membrana no se conoce Sin embargo, parece que actúa en una ruta de actividad lítica en la que participan diferentes componentes, algunos de los cuales son secretados (como TcTOX) y otros no (el caso de LYT1). Se puede pensar que, debido a las capacidades infectivas de los parásitos que expresan la forma completa de la proteína, y en base a su localización en la membrana, pueda actuar directamente desde ella alterando la permeabilidad de la membrana de la vacuola fagolisosómica y facilitando la actividad del resto de componentes. Esta hipótesis está apoyada por la estrecha relación que se ha observado que existe entre la membrana del parásito y la membrana de la vacuola que lo rodea, que permitiría una acción casi directa [Lopez y col., 2002]. Cepas de *L. monocitogenes* (patógeno intracelular) expresando perfringolisina O (PFO, de *Clostridium perfringens*, patógeno extracelular) en lugar de LLO, eran capaces de escapar de la vacuola. Aunque se ha visto que la capacidad



hemolítica de la PFO era muy baja, los organismos que la expresaban eran capaces de escapar de la vacuola. Esto sugería que la unión a la membrana de la vacuola podía ser suficiente para la lisis vacuolar, de forma que la lisis de los glóbulos rojos y de la vacuola no tenían porqué estar correlacionadas [Jones y col., 1996]

Cuando se mantenían las infecciones a largo plazo, aparecían células infectadas con el citosol repleto de amastigotes mutantes nulos. Si consideramos que la ausencia de LYT1 está bloqueando la salida de la vacuola, y por tanto impidiendo la completa transformación en la forma amastigota replicativa, con lo cual sería de esperar que el parásito muriera, es difícil de explicar este hecho. Además, según los resultados obtenidos respecto al estadio preferente en los sobre nadantes de las infecciones de mutantes nulos (amastigotes), considerando la capacidad infectiva de los mismos, y el porcentaje que parece seguir el proceso infectivo en los mutantes, podía ocurrir que existieran rutas alternativas de entrada en la célula, que permitieran al parásito dirigirse directamente al citosol. Se ha descrito que los amastigotes intracelulares pueden escapar por lisis de la célula infectada, y pueden infectar células fagocíticas y no fagocíticas. Tienen más capacidad de infectar células Vero y HeLa que la forma tripomastigote. Parece que los amastigotes se internalizan en periferia celular donde se produce una acumulación de actina que sería una barrera física para los lisosomas. Una vez dentro, se desensamblan los filamentos de actina y se produce la fusión de los lisosomas con la vacuola parasitofora inicial. Avanzando hacia la región perinuclear se fusiona con más lisosomas. Por tanto, parece que cada forma parasitaria desarrolla una respuesta específica para interactuar e invadir un tipo de célula particular [Procopio y col., 1998]

La situación postulada de diferentes mecanismos de entrada por parte de *Trypanosoma cruzi* está empezando a ser investigada. Cuando se inhibe la fosforilación de P175 sólo se bloquea en parte la invasión indicando que deben existir vías en la entrada del parásito que son independientes del proceso de fosforilación. Estas vías pueden ser distintas en metas y tripos, que expresan diferentes moléculas de superficie, y puede que sean más eficientes en tripomastigotes, ya que entran en mayor número que los metacíclicos [Favoreto y col., 1998]. Por otro lado, utilizando parásitos mutantes nulos para la enzima de *T. cruzi* oligopeptidasa B, implicada en los acontecimientos que conducen a la invasión, se observó que existía una proporción de parásitos que sigue siendo infectiva, lo que indicaba que el parásito era capaz de usar al menos dos vías independientes para la invasión:



1.- mediada por la oligopeptidasa B, que implica la movilización de los depósitos de Ca intracelular.

2.- independiente de la oligopeptidasa B, que también depende de Ca, pero no de su liberación de los depósitos anteriores. En este sentido, el Ca podría provenir del medio debido a que el parásito esté afectando la permeabilidad de la membrana de la célula, en concreto los canales de Ca de la membrana plasmática; que sean de depósitos intracelulares diferentes a los anteriores; que exista una vía independiente de la oligopeptidasa B que active los canales de Ca de la membrana plasmática (por ejemplo, podría ser la vía que utiliza los receptores del TGFB). [Caler y col., 1998]. De hecho, aunque se observaron elevaciones transientes de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, tanto en los parásitos mutantes nulos para la oligopeptidasa B como en los parásitos salvajes, las señales producidas por los mutantes estaban retrasadas y eran muy tenues. En cambio, la capacidad para disparar una elevación del AMPc en el hospedador no estaba alterada. Parece que la modulación de los niveles de AMPc afectó preferencialmente a la capacidad invasiva residual de los mutantes en la enzima, sugiriendo que esta vía de señalización puede tener un papel predominante en ausencia de la vía mayoritaria dependiente de oligopeptidasa B [Caler y col., 2000].

Se piensa que existen al menos dos mecanismos principales de entrada: uno corresponde a un proceso de fagocitosis típico y el otro implica la formación de vacuola fagolisosómica. Parece que ambos mecanismos pueden ocurrir en el mismo tipo celular., indicando que el parásito puede modular el mecanismo usado para penetrar en la célula [Carvalho y col., 1999]. Está bien establecido que la glicoproteína gp83 dispara, a través de receptores de la célula hospedadora, un proceso de transducción de señal que conduce a la entrada del parásito. Sin embargo, cuando se bloquea el ligando con anticuerpos, resulta que sigue habiendo infección por lo que se suponen mecanismos alternativos de entrada como el mediado por gp85 [Villalta y col., 2001]. Además, se ha comprobado que cepas diferentes de *T. cruzi* tienen diferente eficacia en la entrada a las células, lo que sugiere que existe una expresión diferencial de moléculas de superficie cuya interacción con los receptores celulares respectivos puede activar diferentes vías de señalización que conducen a procesos de internalización de diferente eficacia. Por ejemplo: cepa CL usa gp82, activa PTK y PLC, IP3 y Ca. Cepa G usa una ruta independiente de PTK, que es dependiente de AMPc. El AMPc parece tener un importante papel en el control del crecimiento y la diferenciación de *T. cruzi* [Neira y col., 2002]. Anteriormente se había observado que





#### VI.6.4 Cambio de estadio

Para completar con éxito el ciclo de infección, los parásitos deben pasar eficientemente a través de diferentes estadios de desarrollo. Consecuentemente se podía pensar que la infectividad reducida de los parásitos deficientes en *LYT1* podía haber sido un efecto indirecto de la incapacidad de los mutantes para completar su ciclo de vida. De hecho, cuando se contabilizaron los parásitos resultantes de las infecciones secundarias llevadas a cabo por las distintas líneas de parásitos (salvajes, mutantes simples y mutantes nulos) se observó que mientras que el estadio predominante en los sobre nadantes de las infecciones producidas por los parásitos salvajes era el tripomastigote, los sobre nadantes producidos por los mutantes mostraban preferencialmente amastigotes, como forma liberada al medio extracelular. Principalmente esto parecía indicar que ocurría la ruptura de la célula debido a la carga parasitaria antes de que finalizase el cambio de estadio, en las líneas mutantes. Se ha visto en otros organismos parásitos como *Legionella pneumophila*, que los mutantes defectivos en la actividad formadora de poros, son defectivos en la salida de la célula pero se replican intracelularmente como la cepa salvaje [Gao y Kwaik, 2000 #837].

Sin embargo, para determinar cómo la deficiencia en *LYT1* podría afectar la capacidad del parásito para completar su ciclo de desarrollo, se llevó a cabo un experimento de transición de estadio *in vitro*. Los resultados (figura V.30) muestran que, después de ser transferidos al medio DMEM, las líneas deficientes se convierten rápidamente en parásitos semejantes a amastigotes extracelulares. El experimento se mantuvo durante un tiempo, en el que el título completo de cada cultivo continuó aumentando, eliminando la posibilidad de que los epimastigotes mutantes fueran menos viables en DMEM que los epimastigotes salvajes. Del mismo modo, se observó una mayor proporción de metacíclicos en las líneas mutantes respecto a los parásitos salvajes cuando se dejó que los cultivos de epimastigotes progresaran a la fase estacionaria. De esta manera, parecía que en cultivos axénicos los parásitos de las líneas mutantes cambiaban de estadio (tanto de epimastigotes a amastigotes como de epimastigotes a metacíclicos) de forma mucho más rápida que los parásitos salvajes. En cambio en presencia de células parecía que los mutantes se quedaban retenidos en la fase amastigota. Se ha podido observar, en condiciones generales, que, en contraste con los amastigotes intracelulares que se diferencian a tripomastigotes [Gutteridge y col., 1978; Zaidenberg y col., 1995], los extracelulares lo hacen a epimastigotes [Engel y Dvorak.,



1988] En cualquier caso si que existen, como consecuencia de la deficiencia en LYT1, alteraciones en el ciclo de desarrollo del parásito relacionadas con la velocidad del cambio de estadio respecto a las líneas mutantes, que no le impiden completar su ciclo de vida. El porqué no se llega a observar un aumento en el título de tripomastigotes metacíclicos en las líneas mutantes en el medio DMEM (aunque si ocurre cuando se utiliza LIT), no está claro. Es posible que bajo nuestras condiciones experimentales la forma amastigote se desarrolle directamente desde la forma epimastigote, o que el parásito pase a través del estadio de tripomastigote metacíclico muy rápidamente, lo cual explicaría los resultados relacionados con el estadio preferente en los sobrenadantes de las infecciones secundarias. El análisis del cambio de estadio en los mutantes nulos transfectados con la forma completa y truncada de la proteína reveló que mientras que los parásitos expresando LYT1 completa se transformaron en amastigotes de la misma forma que los mutantes nulos, los parásitos expresando LYT1 $\delta$ atg, lo hacían como la cepa salvaje. En esta ocasión se cuantificó además el porcentaje de tripomastigotes en el medio DMEM, donde los parásitos expresando LYT1 completa se comportaron como la línea de mutantes nulos, y los que expresaban LYT1 $\delta$ atg, lo hacían como la línea salvaje. Estos resultados permitían asociar parte de los acontecimientos relacionados con el desarrollo del parásito con la forma truncada de LYT1, y proponer un modelo de intervención de la proteína. Así, una posible explicación para la conversión de estadio acelerada en los parásitos deficientes de *LYT1* podría ser suponer que existe una vía común en el proceso de desarrollo de amastigotes y metacíclicos. En esta vía, el producto del gen *LYT1* actuaría como un supresor del cambio de estadio en epimastigotes. Por lo tanto, se mantendría el perfil de expresión de los genes propios de la forma epimastigota, mientras que estaría suprimida la expresión de proteínas específicas para cualquiera de los otros dos estadios. Cuando la expresión de *LYT1* es inhibida, de forma normal, o por un proceso de mutación, deja de existir esa supresión, y se produce la expresión de proteínas específicas de las formas amastigotas o tripomastigotas, dependiendo del medio de cultivo. En cambio cuando LYT1 está presente, se mantiene la expresión de los genes específicos del estadio epimastigote. En general, las transformaciones que se producen durante el ciclo de vida de *T. cruzi* en cultivos libres de células pueden ser inducidas o inhibidas por cambios de la temperatura y de la composición de los medios de cultivo. La transformación de tripos a amas ocurre tanto in vivo como in vitro con una velocidad que depende de la temperatura o de la adición de plasma al medio. Se ha postulado que podrían



ser las proteínas de choque térmico las responsables de la transformación de los epimastigotes al cambiar la temperatura (como se ha visto que ocurre en *Leishmania* y debido a la alta conservación de este tipo de proteínas) [Zaidenberg y col., 2000]. LYT1 podría estar relacionada de alguna forma con la expresión de este tipo de proteínas. También podría ocurrir que LYT1 estuviera implicada en una vía de transducción de señales que dirija el cambio de estadio. La adenilato ciclasa es una enzima de la membrana plasmática que parece controlar el AMPc. Se ha descrito que la activación de esta enzima inhibe la proliferación de amastigotes y su diferenciación a epimastigotes [De Castro y col., 1991]. De hecho, se ha visto que durante el crecimiento celular de *T. cruzi* hay dos sistemas de transducción de señal actuando en direcciones opuestas: el sistema de la fosfolipasa C (que activa el crecimiento) que actúa a través de IP3, por un lado, y DAG y PKC por otro, y el sistema de AC/AMPc (inhibitorio) [Oliveira y col., 1993]. Podría ser que LYT1 interviniese en este último sistema. El que la forma truncada pudiese regular el cambio de estadio parece que también es, al igual que ocurre con la intervención de la forma completa de la proteína en la ruta lítica, dependiente del pH. Así, Kanbara y col., en 1990 describieron que el bajo pH aceleraba la transformación de tripas a amastigotes. Esto implica la posibilidad de que el cambio de pH en el fagosoma dispare el proceso de diferenciación. De hecho, cuando se incuban tripas a pH 5.0 durante dos horas aunque se transfieran a pH 7.0 ya están comprometidos a desarrollarse como amastigotes [Tomlinson y col., 1995]. Podría pensarse que el pH ácido inactivara de alguna forma, por ejemplo a través de cambios en la conformación de la proteína que expusiera ciertos residuos a ser modificados, la forma truncada de LYT1, de modo que dejaran de estar reprimidos los genes específicos de amastigotes y tripomastigotes. Otra posible intervención del pH con relación a LYT1 y el cambio de estadio podía ocurrir a través de la degradación de la proteína en el proteosoma, dejando de reprimir ciertos genes y permitiendo su ausencia la expresión de otros específicos de uno u otro estadio. Así, en los acontecimientos de cambio de estadio se ha descrito la intervención del proteosoma, que actuaría rompiendo proteínas reguladoras clave. Este hecho parece proporcionar el mecanismo de cambio que inicia el proceso de transición de estadio. En las células eucarióticas, los sustratos destinados para degradación son reconocidos por ubiquitin protein ligasas. Puede que la expresión de genes de ubiquitina en *T. cruzi* esté regulada por cambios en pH y temperatura ambiental y por otras condiciones de estrés que conduzcan a remodelación estadio específica. Puede que las variaciones en esas



condiciones conduzcan a que la forma truncada de LYT1 se dirija al proteosoma y sea degradado [Gonzalez y col., 1996]

Otra posibilidad es que LYT1 esté relacionada con proteínas que presentan dominios unidos a glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esta estructura sirve como anclaje proteico en la mayoría de eucariotas. Se ha visto que podría intervenir por alguna de las dos formas siguientes afectando a la división nuclear. Por un lado parece que la pérdida de algunas proteínas ancladas por GPI o GPIs libres no unidos a proteínas, podrían inhibir la mitosis. Ambos tipos de mediadores se encuentran en la membrana de amastigotes intracelulares, por lo que podrían actuar como receptores de señales originadas en el citoplasma de las células hospedadoras para disparar la proliferación de los amastigotes. Por otro lado, es posible que controlen la división nuclear de *T. cruzi*. De hecho, el RE, donde los GPIs son sintetizados, se continua con la membrana externa del núcleo. Esto implica que podrían estar presentes en la membrana nuclear y afectar a la mitosis desde ella. En este sentido, y según la localización de la forma truncada de LYT1, presente en el núcleo, y las reflexiones realizadas sobre la forma de traducción de LYT1 a través del proceso de "splicing" y la intervención del retículo endoplasmático, podría ser que la actividad de la proteína estuviera ligada a influir en la mitosis desde la membrana nuclear [Garg y col., 1997]

Hasta 1998 no se había descrito ninguna proteína reguladora del ciclo celular en *T. cruzi*. Se trata de quinasas dependientes de ciclinas, que se han descrito como esenciales en el control del ciclo celular de eucariotas. *T. cruzi* tiene complejos cambios morfogénicos a lo largo de su ciclo de vida. Los metacitos están detenidos en G1 y siguen cuando se diferencian a amastigotes. La replicación del núcleo y del kinetoplasto está coordinada. Mecanismos moleculares especiales tendrían que haber evolucionado de acuerdo con los requerimientos específicos del parásito. La organización génica de estas proteínas recuerda mucho a la de LYT1. Así, estudiando la secuencia de *tzcrk3* se observa que produce 2 transcritos con la misma pauta abierta de lectura pero diferente región 5' no traducida. *Tzcrk1* tiene 4 transcritos con igual ORF pero diferente UTR. Son diferentes en longitud debido al uso de diferentes AG como aceptores de "splicing" a través de un proceso de "splicing" alternativo. Cuando se analizan por "Southern", se observa que son de copia única aunque muestran diferentes intensidades en la señal de hibridación y además dobles bandas con *ecor1*, lo que indicaría cromosomas homólogos polimórficos o alelos con diferente número de repeticiones (ambas características típicas del genoma de kinetoplastidos) [Gomez y col., 1998]



### VI.6.5 Significado biológico de la actividad del gen *LYT1*

Durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, ocurren diferentes procesos de los que no se conoce demasiado. Por un lado, se encuentran todos los acontecimientos que están implicados en los cambios morfogénicos que originan los distintos estadios del parásito. Éstos se desarrollan dependiendo de las condiciones para sobrevivir en los distintos ambientes con los que se enfrentan a lo largo de su ciclo vital: insecto vector, interior de la vacuola fagolisosómica, citosol, o ambiente extracelular en el hospedador vertebrado. Uno de los momentos clave se presenta cuando el parásito entra en contacto con la célula hospedadora, originando la reorganización de los lisosomas y su fusión a la membrana plasmática, llegando a la formación de una vacuola que rodea al parásito en el punto de ataque a la membrana. Para completar su ciclo de vida, los parásitos deben escapar de esa vacuola, para lo que se ha propuesto la intervención de proteínas que parecen ser funcionalmente parecidas a la porina del complemento. Estas proteínas producirían poros en la membrana de la vacuola, quedando los parásitos libres en el citosol, donde terminarían de transformarse a amastigotes. En este sentido, la implicación de una nueva proteína, LYT1, en la posible ruta lítica que conduce a la ruptura de la vacuola fagolisosómica ha sido de gran importancia [Cortés, A., tesis doctoral 1998]. En el trabajo presentado en esta tesis se ha demostrado que los parásitos deficientes en el gen *LYT1* muestran alteraciones en el proceso de cambio de estadio y en la infectividad. La reconstitución diferencial con cada una de las formas derivadas del gen a través de un proceso de “*splicing*” alternativo ha permitido asociar de manera independiente esos fenotipos a la forma truncada de la proteína o la forma completa, respectivamente. La forma completa de LYT1, localizada en la membrana plasmática de los parásitos, estaría implicada en la ruta lítica, interviniendo además en la capacidad infectiva de los parásitos. Su modo de acción podría ser directo sobre la membrana de la vacuola, permitiendo una alteración de la permeabilidad inicial y posterior reclutamiento de otros factores, que originarían la ruptura final. La forma de la proteína que no presenta los primeros 28 aminoácidos de la forma completa, se encuentra asociada al núcleo. Esta forma está asociada a los procesos que intervienen en el cambio de estadio, probablemente disparando la expresión o represión de los genes implicados, a través de su intervención en alguna vía de transducción de señales. Ambas formas de la proteína presentan básicamente la misma secuencia proteica, y se producen en todos los estadios. Sin embargo, existe una



elección mayoritaria de una u otra forma dependiendo del estadio del parásito, es decir, de las condiciones ambientales que tiene que superar. Si se trata de epimastigotes, presentes en el insecto, la forma mayoritaria es la nuclear, produciéndose el control del cambio de estadio. Si estamos hablando de amastigotes o tripomastigotes, la forma mayoritaria es la de membrana, interviniendo en el proceso de infección celular. La activación de una u otra forma en un momento dado parece depender básicamente del efecto del pH del medio, que podría actuar directamente sobre la proteína o a través de otras proteínas moduladas por su efecto. En cualquier caso, los parásitos son organismos altamente adaptados a los procesos infectivos que producen. Por ejemplo, en *Leishmania* se ha postulado que la leishporina, activa a pH 5.5 y 37°C, principalmente, pero también a pH 7.0 y 23°C, intervenga en la rotura de la membrana de la vacuola fagolisosómica y la membrana plasmática de la célula, también en el proceso de internalización del parásito jugando un papel activo facilitando la entrada por alteración de la permeabilidad de la membrana y que también influya en la obtención de nutrientes desde la hemoglobina, pudiendo ser utilizada por el parásito para lizar eritrocitos del insecto.

En el caso de *T. cruzi*, una estrategia fundamental ha sido el mantener a través de la evolución una enorme cantidad de información nuclear que le ha permitido tener secuencias genómicas muy similares. Se ha comprobado que este hecho es muy importante para su supervivencia, ya que, probablemente, pequeñas modificaciones en genes muy similares, hayan sido parte de su éxito a la hora de establecer infecciones en células muy diferentes [Giordano y col., 1999]. Otro proceso que puede estar utilizando este parásito puede ser el que se describe en esta tesis. Se trata de utilizar la misma secuencia génica que, controlada adecuadamente, de lugar a productos con diferente modo de acción. El éxito que le produce ese control diferencial se ha seleccionado a lo largo de la evolución y probablemente afecte a otros elementos.

En este sentido, y como perspectivas futuras, se hace necesario integrar la actividad de ambas formas de LYT1 en rutas concretas de actuación en el ciclo de vida del parásito. Así, parece que no es probable que la proteína LYT1 sea por sí sola responsable de la actividad hemolítica, sino que esté implicada formando parte de un complejo multiproteico o en un paso temprano que conduzca a la actividad lítica. También es probable que el papel de LYT1 en el desarrollo implique interacciones con proteínas no identificadas aún. Por lo tanto, identificar proteínas con las que LYT1 estaría interaccionando sería de gran interés e



importancia para intentar resolver algunas contradicciones aparentes que surgen de los diferentes fenotipos que muestran los parásitos deficientes en LYT1. Entre las metodologías diferentes que se podrían usar para estudiar las posibles interacciones proteína-proteína se encuentran el sistema de doble híbrido en levaduras y el *phage display*. De este modo, y usando metodologías genéticas se puede llegar a desentrañar la importancia de las interacciones moleculares en el parásito.

La cristalización de la proteína permitiría además conocer las posibles diferencias entre las dos formas de la misma considerando las alteraciones conformacionales dependiendo de factores ambientales y los posibles sitios de interacción con otros elementos tanto del parásito como de la célula hospedadora.

Aunque es muy importante comprender los procesos implicados en el cambio de estadio, muy poco se conoce actualmente acerca de las proteínas implicadas en estos procesos durante el ciclo de vida de los parásitos. La incapacidad para estudiar el cambio de estadio de una forma controlada ha sido uno de los principales obstáculos para este tipo de análisis. Sin embargo, el fenotipo de cambio de estadio acelerado que muestran los parásitos deficientes en *LYT1*, proporciona algunos datos acerca del control del desarrollo. Ese fenotipo está de acuerdo con el hecho de que LYT1 actúe como supresor de ciertos genes específicos de cambio de estadio. Se podría estudiar el patrón de proteínas que se expresan en los parásitos mutantes y en los salvajes y por comparación se podrían identificar las moléculas implicadas, sobre todo las de los momentos tempranos, que son las que más probablemente tengan un papel regulador del proceso. Ya que los parásitos deficientes en LYT1 muestran un cambio acelerado de epimastigotes tanto hacia amastigotes como hacia tripomastigotes metacíclicos, es probable que algunas de las proteínas sean comunes a ambos procesos. Una manera de concretar estos resultados sería a través de análisis de geles bidimensionales que permitieran la comparación de los proteomas de los mutantes en LYT1 y los parásitos salvajes. La capacidad de un organismo o tipo celular para responder a estímulos es dependiente de su capacidad para expresar conjuntos específicos de proteínas. Por tanto, identificando las proteínas implicadas en tales respuestas, se pueden identificar los procesos adaptativos que tienen lugar a la hora de enfrentarse a condiciones cambiantes. Las tecnologías recientes han hecho posible estudiar el perfil completo de proteínas expresadas en un organismo, siendo por tanto posible comparar y contrastar los proteomas de los parásitos mutantes y salvajes. Se trata de identificar proteínas cuyo patrón de expresión se



halla alterado en las líneas deficientes en *LYT1* con el objetivo de identificar las moléculas implicadas en el proceso de cambio de estadio. Entre éstas se incluirán las que se expresen específicamente en los mutantes o las que los hagan en la cepa salvaje, que estarán inactivadas en los mutantes. Una vez identificadas las proteínas se realizará un análisis de los genes que las codifican y se procederá a su estudio en el parásito mediante la realización de sustituciones génicas. El paso siguiente sería el estudio de genes específicos de estadio que muestran patrones de transcripción alterados en los mutantes *LYT1*, lo cual podría llevarse a cabo utilizando microarrays). Todos estos estudios pretenden completar los anteriores de tipo proteómico. De este modo, se trata de estudiar a la interacción de LYT1 con otros elementos en el sistema biológico del parásito y en el ámbito de la expresión de RNA, la alteración de la misma en diferentes genes en las líneas mutantes en LYT1.





# Conclusiones



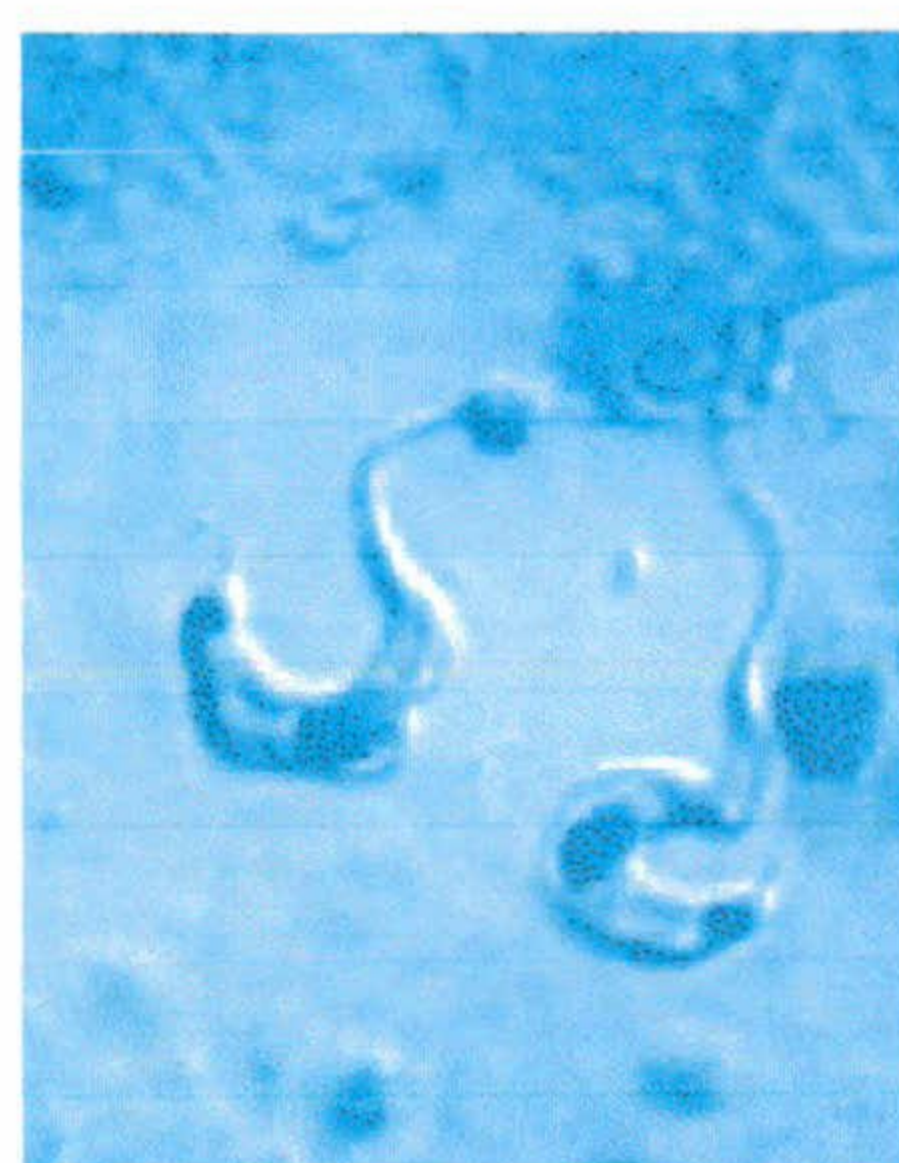
## VII CONCLUSIONES

1. *El análisis de las secuencias nucleotídicas correspondientes a cada alelo del gen LYT1 revela diferencias en la región 3', que se traducen en la existencia o ausencia de diferentes sitios de restricción. La ausencia o presencia del sitio PstI de la posición 2999 de la región 3' del gen se ha utilizado para distinguir a los que se ha denominado alelo LYT1a y LYT1b, respectivamente. Se concluye que el alelo a se localiza en el cromosoma VI, mientras que el alelo b está localizado en el cromosoma XII*
2. *Los cambios en la secuencia de nucleótidos se traducen en cambios de aminoácidos individuales de distinto tipo, que afectan sobre todo a la secuencia derivada del alelo LYT1a, se concentran principalmente en la región carboxiterminal de la proteína, y son del tipo no conservativo.*
3. *Anticuerpos dirigidos frente a la región aminoterminal de la proteína produjeron el reconocimiento de otras proteínas con las que se relacionó a LYT1 indicando su posible participación en la actividad lítica. Anticuerpos dirigidos frente a la región carboxiterminal de la proteína reconocen específicamente la proteína LYT1, lo que indica que las diferencias en la familia de proteínas a las que posiblemente pertenezca LYT1 se concentran en esa región, estando la zona aminoterminal más conservada.*
4. *Como resultado de un proceso de "trans splicing" alternativo, se producen tres diferentes RNA mensajeros del gen LYT1: dos de ellos dan lugar a la proteína LYT1 completa (cuando el "splicing" ocurre en la posición -46 y -14, respecto al ATG iniciador de la pauta abierta de lectura del gen). Cuando la adición del miniexón ocurre en la posición +10 se origina un RNAm que codifica una forma truncada que pierde los primeros 28 aminoácidos de la secuencia completa de la proteína. El proceso de "splicing" en la posición -14 ocurre en el dinucleótido GG y es minoritaria.*
5. *Todas las variantes que se producen debido a las diferentes posibilidades en el procesamiento de los RNAm del gen LYT1 pueden ser producidas por ambos alelos del gen.*
6. *Los aspectos del procesamiento alternativo están regulados diferencialmente durante el ciclo de vida del parásito. Aunque ambas formas de la proteína están presentes en todos*



*los estadios, la forma completa de LYT1 es mayoritaria en tripas- y amastigotes, mientras que en epimastigotes se produce preferencialmente la forma truncada.*

7. *Las dos formas de LYT1 tienen una localización diferencial, de modo que la forma completa de la proteína se localiza en la membrana y la forma truncada se localiza en el núcleo. Las dos formas de LYT1 poseen los elementos necesarios en su estructura primaria para dirigir su localización final, ya sea a la membrana plasmática o núcleo, y, de alguna manera este proceso es dependiente de estadio, ya que es éste el que determina que forma de la proteína es expresada mayoritariamente.*
8. *La caracterización biológica de LYT1 en los mutantes nulos transfectados independientemente con una u otra forma de la proteína permite la asociación de los fenotipos observados en cada caso. La actividad hemolítica y la capacidad infectiva asociada se debe a la actividad de la forma completa de la proteína, localizada en la membrana plasmática de los parásitos, mientras que parte de los acontecimientos relacionados con el desarrollo del parásito están relacionados con la actividad de la forma truncada de LYT1.*
9. *La regulación de LYT1 se ejerce en el estadio del parásito en el que se produce la expresión de la proteína en cada momento, lo que está relacionado con el ambiente al que se enfrenta para completar su ciclo de vida. En tripas- y amastigotes la forma de la proteína mayoritaria es la forma completa localizada en la membrana, que es activa en la vacuola fagolisosómica (pH ácido); mientras que en epimastigotes, la forma intracelular de la proteína LYT1 sería activa a pH neutro. En este sentido el pH del medio podría ser otro nivel de regulación, ya que dependiendo del pH del medio, una de las formas de LYT1 estaría activa y la otra no. Es posible que el pH intervenga determinando la exposición o no de ciertas cadenas laterales y por tanto su susceptibilidad a ser modificadas. Podría ser que se produjeran preferentemente uno u otro tipo de modificaciones dependiendo de la conformación de la proteína, que a su vez dependería de la forma expresada en cada momento.*



# Bibliografía



## VIII BIBLIOGRAFÍA

- Achbarou, A., O. Mercereau-Puijalon, and A. Sadak.** (1991). Differential targeting of dense granules proteins in the parasitophorous vacuoles of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. **103**:321-329.
- Achouak, W., T. Heulin, and J.M. Pages.** (2001). Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett.* **199**:1-7.
- Aikawa, M., M. Torii, A. Sjolander, K. Berzins, P. Perlman, and L.H. Miller.** (1990). Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Exp. Parasitol.* **71**:326-329.
- Alcántara, A., and Z. Brener.** (1980). Role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. *Exp. Parasitol.* **50**:1-6.
- Almeida-Campos, F.R., and M.F. Horta.** (2000). Proteolytic activation of leishporin: evidence that *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis* have distinct inactive forms. *Mol Biochem Parasitol.* **111**:363-75.
- Alpuche Aranda, C.M.** (1994). *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J. Exp. Med.* **179**:601-608.
- Alves, M.J., G. Abuin, V.Y. Kuwajima, and W. Colli.** (1986). Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **21**:75-82.
- Amako, K., S.N. Wai, A. Umeda, M. Shigematsu, and A. Takade.** (1996). *Microbiol. Immunol.* **40**:749-754.
- Amino, R., R.M. Martins, J. Procopio, I.Y. Hirata, M.A. Juliano, and S. Schenkman.** (2002). Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J Biol Chem.* **277**:6207-13.
- Anderson, R.G.W., and I. Orci.** (1988). A view of acidic intracellular compartments. *J. Cell. Biol.* **81**:4838-4842.
- Andrews, M.W., and D.A. Portnoy.** (1994b). Cytolysins form intracellular pathogens. *Trends in Microbiology.* **2**:261-262.
- Andrews, N.** (1995). Lysosoma recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends in cell biology.* **5**:133-7.
- Andrews, N., and W. Colli.** (1982). Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* **29**:264-269.
- Andrews, N., and P. Webster.** (1991). Phagolysosomal escape by intracellular pathogens. *Parasitology Today.* **7**:335-340.
- Andrews, N., and M. Whitlow.** (1989a). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol Biochem Parasitol.* **33**:249-56.
- Andrews, N.W., and M.B. Whitlow.** (1989b). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol Biochem Parasitol.* **33**:249-56.



- Andrews, N.W.** (2002). Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *Journal of Cell Biology*. **158**:389-394.
- Andrews, N.W., C.K. Abrams, S.L. Slatin, and G. Griffiths.** (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell*. **61**:1277-87.
- Andrews, N.W., and W. Colli.** (1981). Interiorization of *T. cruzi* in cultured mammalian cells inhibition by N-acetyl-glucosamine. *XII Annual Meeting on Basic Research on Chagas disease, Caxambu, Brasil, P81, res 104*.
- Andrews, N.W., K.S. Hong, E.S. Robbins, and V. Nussenzweig.** (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. **64**:474-84.
- Andrews, N.W., S. Schenkman, V. Ley, M.B. Whitlow, E.S. Robbins, and V. Nussenzweig.** (1988). *Trypanosoma cruzi*: mechanisms of cell-invasion and intracellular survival. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **83 Suppl 1**:452-5.
- Aymerich, S., and S. Goldenberg.** (1989). The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypanosomatids. *Exp Parasitol*. **69**:107-15.
- Bakalara, N., G. Kendall, P. Michels, and F. Opperdoes.** (1991). *Trypanosoma brucei* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes are stage-regulated at the transcriptional level. *EMBO J*. **10**:3861-3868.
- Baldwin, T.J., W. Ward, A. Aitken, S. Knutton, and P.H. Williams.** (1991). *Infect. Immun*. **59**:1599-1604.
- Baneix, F., and G. Georgiou.** (1990). In vivo degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J. Bacteriol*. **172**:491-494.
- Barbosa, H.S., and N. de Meirelles Mde.** (1992). Ultrastructural detection in vitro of WGA-, RCA I-, and Con A-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. **78**:404-9.
- Barr, S.C., W. Han, N.W. Andrews, J.W. Lopez, B.A. Ball, T.L. Pannabecker, and R.F. Gilmour, Jr.** (1996). A factor from *Trypanosoma cruzi* induces repetitive cytosolic free Ca<sup>2+</sup> transients in isolated primary canine cardiac myocytes. *Infect Immun*. **64**:1770-7.
- Beauregard, K.E., K.D. Lee, R.J. Collier, and J.A. Swanson.** (1997). pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med*. **186**:1159-63.
- Bellofatto, V., J.E. Torres-Muñoz, and G.A. Cross.** (1991). Stable transformation of *Leptomonas seymouri* by circular extrachromosomal elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**:6711-6715.
- Bernheimer, A.W., and B. Rudy.** (1986). Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochem. Biophys. Acta*. **864**:123-141.
- Bhakdi, S., and J. Tranum-Jensen.** (1986). Membrane damage by pore-forming bacterial cytolytins. *Microb Pathog*. **1**:5-14.
- Bhakdi, S., and J. Tranum-Jensen.** (1988). Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolytins. *Prog Allergy*. **40**:1-43.

- Bhaumik, M., S. Das, S. Adhya, , , and O.P.** 2:197-205. (1991). Evidence for translational control of beta-tubulin synthesis during differentiation of *Leishmania donovani*. *Parasitology*. **103 Pt 2:197-205**.
- Bielecki, J., P. Youngman, P. Connelly, and D.A. Portnoy.** (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature*. **345:175-6**.
- Bisaggio Rda, C., S.L. de Castro, H.S. Barbosa, A. Brandao Cde, and P.M. Persechini.** (1997). *Trypanosoma cruzi*: resistance to the pore forming protein of cytotoxic lymphocytes--perforin. *Exp Parasitol*. **86:144-54**.
- Blum, B., N. Bakalara, and L. Simpson.** (1990). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "Guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provided the edited information. *Cell*. **60:189-198**.
- Borst, P., F. Fase-Fowler, A. Frasch, J.K.J. Hoeijmakers, and P.J. Weijers.** (1980). Characterization of DNA from *Trypanosoma brucei* and related trypanosomes by restriction endonuclease digestion. *Mol. Biochem. Parasitol*. **1:221**.
- Boschetti, M.A., M.M. Piras, D. Henriques, and R. Piras.** (1987). The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol*. **24:175-181**.
- Brack, C.** (1968). Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *rhodnius prolixus*. *Acta Trop*. **25:289-356**.
- Bradbury, A.F., and D.G. Smyth.** (1987). *Biosci. Rep*. **7:907-916**.
- Brandl, C.H.J., and C.H.M. Deber.** (1986). Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83:917-921**.
- Brener, Z.** (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. **27:347-82**.
- Brener, Z.** (1980). immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol*. **18:247-292**.
- Brener, Z., C.A. Costa, and C. Chiari.** (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **18:450-5**.
- Burleigh, B.A., and N.W. Andrews.** (1995a). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*. **49:175-200**.
- Burleigh, B.A., and N.W. Andrews.** (1995b). A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca(2+)-signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem*. **270:5172-80**.
- Burleigh, B.A., E.V. Caler, P. Webster, and N.W. Andrews.** (1997). A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca2+ signaling in mammalian cells. *J Cell Biol*. **136:609-20**.
- Calderon, I., S.R. Lobos, H.A. Rojas, C. Palomino, L.H. Rodriguez, and G.C. Mora.** (1986). Antibodies to porin antigens of *Salmonella typhi* induced during typhoid infection in humans. *Infect Immun*. **52:209-12**.



- Caler, E.V., R.E. Morty, B.A. Burleigh, and N.W. Andrews.** (2000). Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **68**:6602-10.
- Caler, E.V., S. Vaena de Avalos, P.A. Haynes, N.W. Andrews, and B.A. Burleigh.** (1998). Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Embo J.* **17**:4975-86.
- Campbell, V., and D. Jackson.** (1980). The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA. *J Biol Chem.* **255**:3726-35.
- Cano, M.I., A. Gruber, M. Vazquez, A. Cortes, M.J. Levin, A. Gonzalez, W. Degrave, E. Rondinelli, B. Zingales, J.L. Ramirez, and et al.** (1995). Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol.* **71**:273-8.
- Capron, A., and J.P. Dessaint.** (1989). Molecular basis of host-parasite relationship: toward the definition of protective antigens. *Immunol. Rev.* **112**:28-48.
- Carvalho, T., and W. De Souza.** (1989). Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct. Funct.* **14**:383-392.
- Carvalho, T.M., A.G. Ferreira, E.S. Coimbra, C.T. Rosestolato, and W. De Souza.** (1999). Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol.* **31**:325-33.
- Castro, C., R. Hernandez, and M. Castaneda.** (1981). *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol Biochem Parasitol.* **2**:219-33.
- Cazzulo, J.J., B.M. Franke de Cazzulo, J.C. Engel, and J.J. Cannata.** (1985). End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* **16**:329-43.
- Chen, J., P. Englund, ;, and N. Cozzarelli .** (1995). Changes in network topology during the replication of kinetoplast DNA. *EMBO J.* **14**:6339-47.
- Ciavaglia Mdo, C., T.U. de Carvalho, and W. de Souza.** (1993). Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns. *Biochem Biophys Res Commun.* **193**:718-21.
- Cooper, R., J.A. Inverso, M. Espinosa, N. Nogueira, and G.A. Cross.** (1991). Characterization of a candidate gene for GP72, an insect stage-specific antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **49**:45-59.
- Cortés, A.** 1998. TcPOR: una proteína de *Trypanosoma cruzi* con actividad lítica involucrada en el proceso de infección. In *Bioquímica y Biología Molecular*. Granada, Granada. 160.
- Couto, A.S., R.M. De Lederkremer, W. Colli, and M.J. Alves.** (1993). The glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypomastigote-specific Tc-85 glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. Metabolic-labeling and structural studies. *Eur J Biochem.* **217**:597-602.





- Cross, G.A., and G.B. Takle.** (1993). The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* **47**:385-411.
- Dallagiovanna, B., F. Gamarro, and S. Castanys.** (1996). Molecular characterization of a P-glycoprotein-related *tcpgp2* gene in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **75**:145-57.
- De Araujo, S.M., and E. Chiari.** (1989). [Biological characterization of clones of the Y, CL and MR strains of *Trypanosoma cruzi* in inbred C3H mice]. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **83**:175-81.
- De Castro, S.L., W. De Souza, and M.N. Meirelles.** (1991). Cytochemical localization of adenilate cyclase in the three developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* **38**:580-583.
- De, E., M. Jullien, G. Labesse, J.M. Pages, G. Molle, and J.M. Bolla.** (2000). MOMP (major outer membrane protein) of *Campylobacter jejuni*; a versatile pore-forming protein. *FEBS Lett.* **469**:93-7.
- De Souza, W.** (1989). Components of the cell surface of Trypanosomatids. *Prog. in Parasitol.* **3**:87-184.
- de Titto, E.H., and F.G. Araujo.** (1987). Mechanism of cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: importance of sialidase activity. *Acta Trop.* **44**:273-82.
- Deane, M.P., and A.M. Jansen.** (1988). From a mono to a digenetic life-cycle: how was the jump for flagellates of the family Trypanosomatidae? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **83**:273-5.
- Delbac, F., and D. Soldati.** (2001). *Toxoplasma gondii* myosins B/C: one gene, two tails, two localizations, and a role in parasite division. *J. Cell. Biology.* **155**:613-623.
- Di Noia, J.M., I. D'Orso, L. Aslund, D.O. Sanchez, and A.C. Frasch.** (1998). The *Trypanosoma cruzi* mucin family is transcribed from hundreds of genes having hypervariable regions. *J Biol Chem.* **273**:10843-50.
- Di Noia, J.M., I. D'Orso, D.O. Sanchez, and A.C. Frasch.** (2000). AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem.* **275**:10218-27.
- Di Noia, J.M., G.D. Pollevick, M.T. Xavier, J.O. Previato, L. Mendoca-Previato, D.O. Sanchez, and A.C. Frasch.** (1996). High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **271**:32078-83.
- Di Noia, J.M., D.O. Sanchez, and A.C. Frasch.** (1995). The protozoan *Trypanosoma cruzi* has a family of genes resembling the mucin genes of mammalian cells. *J Biol Chem.* **270**:24146-9.
- Diehn, M., M.B. Eisen, D. Botstein, and P.O. Brown.** (2000). Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nat. Genet.* **25**:58-62.
- Docampo, R.** (2001). Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des.* **7**:1157-64.
- Docampo, R., and S. Moreno.** (1990). The metabolism and mode of action of gentian violet. *Drug Metab Rev.* **22**:161-78.



- Dorta, M.L., A.T. Ferreira, M.E. Oshiro, and N. Yoshida.** (1995). Ca<sup>2+</sup> signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Mol Biochem Parasitol.* **73**:285-9.
- Dvorak, J.A.** (1975). New *in vitro* approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. *New Approaches Am. Trypanosom. Res. Sci. Pub.* **318**:109-120.
- Dvorak, J.A., and M.S. Crane.** (1981). Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. *Science.* **214**:1034-6.
- Dvorak, J.A., T.E. Hall, M.S.J. Crane, J.C. Engel, J.P. McDaniel, and R. Uriegas.** (1982). *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin-induced fluorescence. *J. Protozool.* **29**:430-437.
- Dvorak, J.A., and T.P. Hyde.** (1973). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells *in vitro*. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp Parasitol.* **34**:268-83.
- Engel, J.C., and J.A. Dvorak.** (1988). *Trypanosoma cruzi*: cell biological behavior of epimastigote and amastigote forms in axenic culture. *J Protozool.* **35**:513-8.
- Engel, J.C., C. Torres, I. Hsieh, P.S. Doyle, J.H. McKerrow, and C.T. Garcia.** (2000). Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci.* **113**:1345-54.
- Engvall, E., and P. Perlman.** (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* **8**:871-4.
- Entzeroth, R., J.F. Dubremetz, D. Hodick, and E. Ferreira.** (1986). Immunoelectromicroscopic demonstration of the exocytosis of dense granules contents into the secondary parasitophorous vacuole of *Sarcocystis muris* (Protozoa, Apicomplexa). *Eur. J. Cell. Biol.* **41**:182-188.
- Falkow, S., R.R. Isberg, and D.A. Portnoy.** (1992). The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**:333-363.
- Farina, M., M. Attias, T. Souto-Padron, and W. De Souza.** (1986). Further studies on the organization of the paraxial rod of trypanosomatids. *J. Protozool.* **33**:552-7.
- Favoreto, S., Jr., M.L. Dorta, and N. Yoshida.** (1998). *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Exp Parasitol.* **89**:188-94.
- Fernández, M., M. Muñoz-Fernández, and M. Fresno.** 1993. Mecanismos de evasión inmune por protozoos parásitos. In *Parasitología Molecular*. CSIC, editor, Madrid. 247-271.
- Fernandez, M.A., M.A. Munoz-Fernandez, and M. Fresno.** (1993). Involvement of beta 1 integrins in the binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into human macrophages. *Eur J Immunol.* **23**:552-7.
- Fernández-Cano, A.** (1993a). Análisis molecular del locu KAP de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Fernández-Cano, A.** 1993b. Análisis molecular del locus KAP de *Trypanosoma cruzi*. In *Bioquímica y Biología Molecular*. Granada, Granada.



- Filardi, L.S., and Z. Brener.** (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **81**:755-9.
- Fiori, P.L., P. Rappelli, M.F. Addis, A. Sechi, and P. Cappuccinelli.** (1996). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microb Pathog.* **20**:109-18.
- Fragoso, S.P., and S. Goldenberg.** (1992). Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. *Mol Biochem Parasitol.* **55**:127-34.
- Fuller, R.S., R.E. Sterne, and J. Thorner.** (1988). Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annu.Rev.Physiol.* **50**:345-362.
- Gaillard, J.L.e.a.** (1987). *Infect. Immun.* **55**:2822-2829.
- Gao, L.Y., and Y.A. Kwaik.** (2000). The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol.* **2**:79-90.
- Garcia-Salcedo, J.A., J.L. Oliver, R.P. Stock, and A. Gonzalez.** (1994). Molecular characterization and transcription of the histone H2B gene from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol.* **13**:1033-43.
- Garg, N., M. Postan, K. Mensa-Wilmot, and R.L. Tarleton.** (1997). Glycosylphosphatidylinositols are required for the development of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Infect Immun.* **65**:4055-60.
- Garrido, M.N., G. Racagni, B.M. Pereira, M.A. Rodriguez, H.D. Lujan, D.H. Bronia, and E.E. Machado-Domenech.** (2000). Changes in *Trypanosoma cruzi* phospholipid turnover induced by parasite contact with cell membranes. *Parasitol Res.* **86**:96-100.
- Gavel, Y., and G. von Heijne.** (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* **3**:433-42.
- Gibson, W.C., and M.A. Miles.** (1986). The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *Embo J.* **5**:1299-305.
- Giordano, R., D.L. Fouts, D. Tewari, W. Colli, J.E. Manning, and M.J. Alves.** (1999). Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J Biol Chem.* **274**:3461-8.
- Glaser, P.e.a.** (1988). *EMBO, J.* **7**:3997-4004.
- Glass, D., H. Cheng, B. Kemp, and D. Walsh.** (1986). Differential and common recognition of the catalytic sites of the cGMP-dependent and cAMP-dependent protein kinases by inhibitory peptides derived from the heat-stable inhibitor protein. *J Biol Chem.* **261**:12166-71.
- Gomez, E.B., A.R. Kornblihtt, and M.T. Tellez-Inon.** (1998). Cloning of a cdc2-related protein kinase from *Trypanosoma cruzi* that interacts with mammalian cyclins. *Mol Biochem Parasitol.* **91**:337-51.
- Gonzalez, A., T.J. Lerner, M. Huecas, B. Sosa-Pineda, N. Nogueira, and P.M. Lizardi.** (1985). Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* **13**:5789-804.



- Gonzalez, A., J.L. Rosales, V. Ley, and C. Diaz.** (1990). Cloning and characterization of a gene coding for a protein (KAP) associated with the kinetoplast of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **40**:233-43.
- Gonzalez, J., F.J. Ramalho-Pinto, U. Frevert, J. Ghiso, S. Tomlinson, J. Scharfstein, E.J. Corey, and V. Nussenzweig.** (1996). Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. *J Exp Med.* **184**:1909-18.
- Gorla, N.B., O.S. Ledesma, G.P. Barbieri, and I.B. Larripa.** (1988). Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mutat Res.* **206**:217-20.
- Grand, R.J.** (1989). Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochem J.* **258**:625-38.
- Grellier, P., S. Vendeville, R. Joyeau, I.M. Bastos, H. Drobecq, F. Frappier, A.R. Teixeira, J. Schrevel, E. Davioud-Charvet, C. Sergheraert, and J.M. Santana.** (2001). *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J Biol Chem.* **276**:47078-86.
- Grodberg, J., and J. Dunn.** (1988). ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**:1245-1253.
- Gutteridge, W.E., B. Cover, and M. Gaborak.** (1978). A/JAX inbred mice in chemotherapeutic investigations of experimental Chagas' disease. *Ann Trop Med Parasitol.* **72**:329-38.
- Haag, J., C. O'hUigin, and P. Overath.** (1998). The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Molecular and Biochemical Parasitology.* **91**:37-49.
- Hacker, J.e.a.** (1988). in *Bacteria, Complement and the phagocytic cell* (Cabello, F.C and Pruzzo, C. eds):221-228.
- Hadjuk, S., M.E. Harris, and V.W. Pollard.** (1993). RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *FASEB J.* **7**:54-63.
- Hadjuk, S.L., and R.S. Sabatini.** (1996). RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information. *Molecular Biology of Parasitic Protozoa, in DF Smith and M Parsons (eds)*:134-158.
- Haefliger, J.A., J. Tschopp, D. Nardelli, W. Wahli, H.P. Kocher, M. Tosi, and K.K. Standley.** (1987). Complementary DNA cloning of complement C8 $\beta$  and its sequence homology to C9. *Biochemistry.* **26**:3551-3556.
- Hall, B.F., P. Webster, A.K. Ma, K.A. Joiner, and N.W. Andrews.** (1992). Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: A role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into host cell. *J. Exp. Med.* **176**:313-325.
- Heath, J.P., and B.F. Hollifield.** (1991). Cell locomotion. Actin alone in lamellipodia. *Nature.* **352**:107-108.
- Henriksson, J., L. Aslund, R.A. Macina, B.M. Franke de Cazzulo, J.J. Cazzulo, A.C. Frasch, and U. Pettersson.** (1990). Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **42**:213-23.



- Henriksson, J., B. Porcel, M. Rydaker, A. Ruiz, V. Sabaj, N. Galanti, J.J. Cazzulo, A.C. Frasch, and U. Pettersson.** (1995). Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **73**:63-74.
- Hermann, T., B. Schmid, H. Heumann, and H.U. Göringer.** (1997). A three dimensional working model for a guide RNA from *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research.* **25**:2311-2318.
- Herrera, E.M., M. Ming, E. Ortega-Barria, and M.E. Pereira.** (1994). Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* **65**:73-83.
- Heuser, J.E.** (1989). Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *J. Cell. Biol.* **108**:855-864.
- Ho, J.L., S.G. Reed, J. Soel, S. Arruda, and S. He.** (1992). Interleukin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. *Infect. Immun.* **60**:1984-1993.
- Horta, M.F.** (1997). Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasites. *Trends Microbiol.* **5**:363-6.
- Howard, O.M.Z., A.G. Rao, and J.M. Sodetz.** (1987). Complementary DNA and derived amino acid sequence of the  $\alpha$  subunit of human complement protein C8: identification of a close structural and ancestral relationship to the  $\alpha$  subunit and C9. *Biochemistry.* **26**:3565-3570.
- Huang, J., and L.H. Van der Ploeg.** (1991b). Maturation of polycistronic pre-mRNA in *Trypanosoma brucei*: analysis of transsplicing and poly(A) addition at nascent RNA transcripts from the *hsp70* locus. *Mol. Cell. Biol.* **11**:3180-3190.
- Huang, J., and L.H.T. Van der Ploeg.** (1991a). Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J.* **10**:3877-3885.
- Hummel, H.S., R.D. Gillespie, and J. Swindle.** (2000). Mutational analysis of 3' splice site selection during trans splicing. *J. Biol. Chem.* **275**:35522-531.
- Huyer, M., T.R. Parr, R.E.W. Hancock, and W.J. Page.** (1986). *FEMS Microbiol. Letter.* **37**:247-250.
- Imboden, M.A., P.W. Laird, M. Affolter, and T. Seebeck.** (1987). Transcription of the intergenic regions of the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*: evidence for a polycistronic transcription unit in a eukaryote. *Nucleic. Acids. Research.* **15**:7357-7368.
- Jaconi, M.E., D.P. Lew, J.L. Carpentier, K.E. Magnusson, S. M., and O. Stendhal.** (1990). Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophil. *J. Cell. Biol.* **110**:1555-1564.
- Jacquier, A., ;, and M. Rosbash.** (1986). Efficient trans-splicing of a yeast mitochondrial RNA group II intron implicates a strong 5' exon-intron interaction. *Science.* **234**:1099-104.



- Jones, M.M., P.K. Singh, J.E. Lane, R.R. Rodrigues, A. Nesses, C.C. Suarez, B.J. Bogitsh, and C.E. Carter.** (1996). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro by iron chelating agents. *Arzneimittelforschung*. **46**:1158-62.
- Kahn, S., M. Kahn, W.C. van Voorhis, A. Goshorn, A. Strand, N. Hoagland, H. Eisen, and S. Pennathur.** (1993). SA85-1 proteins of *Trypanosoma cruzi* lack sialidase activity. *Mol Biochem Parasitol*. **60**:149-52.
- Kapler, G.M., K. Zhang, and S.M. Beverley.** (1987). Sequence and S1 nuclease mapping of the 5' region of the hidrofolate reductase-thymidilate synthase gene of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res*. **15**:3369-83.
- Keller, F., W. Hanke, D. Trissl, and T. Bakker-Grunwald.** (1989). Pore-forming protein from *Entamoeba histolytica* forms voltage- and pH-controlled multi-state channels with properties similar to those of the barrel-stave aggregates. *Biochim Biophys Acta*. **982**:89-93.
- Keller, F., C. Walter, U. Lohden, W. Hanke, T. Bakker-Grunwald, and D. Trissl.** (1988). Pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba*: pore formation and hemolytic activity. *J Protozool*. **35**:359-65.
- Kelly, J.M., H.M. Ward, M.A. Miles, and G. Kendall.** (1992). A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res*. **20**:3963-9.
- King, C.H.e.a.** (1993). *Infect. Immun*. **61**:2708-2712.
- Kipnis, T.L., V.L. Calich, and W.D. da Silva.** (1979). Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology*. **78**:89-98.
- Kishimoto, A., K. Nishiyama, H. Nakanishi, Y. Uratsuji, H. Nomura, Y. Takeyama, and Y. Nishizuka.** (1985). Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. **260**:12492-9.
- Koller, B., H. Fromm, E. Galun, and M. Edelman.** (1987). Evidence for in vivo trans splicing of pre-mRNAs in tobacco chloroplasts. *Cell*. **48**:111-9.
- Kornfeld, S., and I. Mellman.** (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**:483-525.
- Koronakis, V.e.a.** (1987). *J. Bacteriol*. **169**:1509-1515.
- Krause, M., and D. Hirsh.** (1987). A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell*. **49**:754-61.
- Kreil, G.** (1984). *Meth. Enzymol*. **106**:218-223.
- Krell, G.** (1990). Processing of precursors by dipeptidylaminopeptidase: a case of molecular ticketing. *Trends Biochem. Sci*. **15**:23-26.
- Kress, Y., B.R. Bloom, M. Wittner, A. Rowen, and H. Tanowitz.** (1975). Resistance of *Trypanosoma cruzi* to killing by macrophages. *Nature*. **257**:394-396.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E.L. Sonnhammer.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. **305**:567-80.



- La Flamme, A., F. Buckner, J. Swindle, J. Ajioka, and W. Van Voorhis.** (1995). Expression of mammalian cytokines by *Trypanosoma cruzi* indicates unique signal sequence requirements and processing. *Mol Biochem Parasit.* **75**:25-31.
- Laine, R.O., and A.F. Esser.** (1989). Identification of the discontinuous epitope in human complement protein C9 recognized by anti-mellitin antibodies. *J. Immunol.* **143**:553-557.
- Laine, R.O., B.P. Morgan, and A.F. Esser.** (1988). Comparison between complement and mellitin hemolysis: anti-mellitin antibodies inhibit complement lysis. *Biochemistry.* **27**:5308.
- Lanar, D.E., L.S. Levy, and J.E. Manning.** (1991). Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**:327-341.
- Lancer, M., D. de Bruin, and S.P.R. Wertheimer, J.V.;** (1994). Organization of chromosomes in *Plasmodium falciparum*: a model for generating karyotypic diversity. *Parasitol. Today.* **10**:3.
- Lanzer, M., K. Fischer, and S.M. Le Blancq.** (1995). Parasitism and chromosome dynamics in protozoan parasites: is the connection? *Mol. Biochem. Parasitol.* **70**:1-8.
- Lario, A., A. Gonzalez, and G. Dorado.** (1997). Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing: equalizing signal-to-noise ratios significantly enhances overall performance. *Anal Biochem.* **247**:30-3.
- Laurent, J.P., and J. Swindle.** (1999). Variation of transient gene expression within single lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* **119**:583-9.
- LeBowitz, J.H., C.M. Coburn, and S.M. Beverley.** (1991). Simultaneous transient expression assays of the trypanosomatid parasite *Leishmania* using  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -glucuronidase as reporter enzymes. *Gene.* **103**:119-123.
- LeBowitz, J.H., H.Q. Smith, L. Rusche, and S.B. Beverley.** (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes and Dev.* **7**:996-1007.
- Lee, M.G., and L.H. Van der Ploeg.** (1990a). Homologous recombination and stable transfection in the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. *Science.* **250**:1583-1587.
- Leippe, M., E. Bahr, E. Tannich, and R.D. Horstmann.** (1993). Comparison of pore-forming peptides from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* **59**:101-9.
- Leippe, M., S. Ebel, O.L. Schoenberger, R.D. Horstmann, and H.J. Muller-Eberhard.** (1991). Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:7659-63.
- Leon, W., D.L. Font, and J. Manning.** (1978). Sequence arrangement of the 16S and 28S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res.* **5**:491.
- Lewin.** 2000. Chapter 8: Protein Localization. *In* Genes VII. U. Press, editor, Oxford. 191-223.
- Ley, V., N.W. Andrews, E.S. Robbins, and V. Nussenzweig.** (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med.* **168**:649-59.



- Ley, V., E.S. Robbins, V. Nussenzweig, and N.W. Andrews. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* **171**:401-413.
- Lichtenheld, M.G., K.J. Olsen, P. Lu, D.M. Lowrey, A. Hameed, H. Hengartner, and E.R. Podack. (1988). Structure and function of human perforin. *Nature.* **335**:448-451.
- Lima, M.F., L.A. Beltz, and F. Kierszenbaum. (1988). *Trypanosoma cruzi*: a specific surface marker for the amastigote form. *J Protozool.* **35**:108-10.
- Lo, R.Y.C., C.A. Strathdee, and P.E. Shewen. (1987). *Infect. Immun.* **55**:1987-1996.
- Lopez, M., C. Huynh, L.O. Andrade, M. Pypaert, and N.W. Andrews. (2002). Role for sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Mol Biochem Parasitol.* **119**:141-5.
- Lowrey, D.M., and J. McLaughlin. (1984). *Infect. Immun.* **45**:731-736.
- Lowrey, D.M., and J. McLaughlin. (1985). *Infect. Immun.* **50**:478-482.
- Lynch, E.C., I. Rosenberg, and C. Gitler. (1982). An ion channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO, J.* **1**:801-804.
- Mair, G., H. Shi, H. Li, A. Djikeng, H.O. Aviles, J.R. Bishop, F.H. Falcone, C. Gavrilescu, J.L. Montgomery, M.I. Santori, L.S. Stern, Z. Wang, E. Ullu, and C. Tschudi. (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *Rna.* **6**:163-9.
- Mancheño, J., M. Oñaderra, A. Martínez del Pozo, P. Díaz-Achirica, D. Andreu, L. Rivas, and J. Gavilanes. (1996). Release of lipid vesicle contents by an antibacterial cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biochemistry.* **35**:9892-9899.
- Manning-Cela, R., A. Cortes, E. Gonzalez-Rey, W.C. Van Voorhis, J. Swindle, and A. Gonzalez. (2001). LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **69**:3916-23.
- Manque, P.M., D. Eichinger, M.A. Juliano, L. Juliano, J.E. Araya, and N. Yoshida. (2000). Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82. *Infect Immun.* **68**:478-84.
- Marañón, C., C. Puerta, C. Alonso, and M.C. López. (1998). Control mechanisms of the H2A genes expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**:313-324.
- Marshall, R.D. (1972). Glycoproteins. *Annu Rev Biochem.* **41**:673-702.
- Martin, F., C. Puertas, M.C. Thomas, C. Maranon, M.E. Patarroyo, J. Martin, C. Alonso, and M.C. Lopez. (1997). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigenic epitope implicated in the infectivity of fibroblast LLC-MK2 cells. *Parasitol Res.* **83**:226-32.
- Martinez-Calvillo, S., I. Lopez, and R. Hernandez. (1997). pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene.* **199**:71-6.
- Matsubayashi, T., T. Wakasugi, ., K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, N. Zaita, T. Hidaka, B. Meng, C. Ohto, M. Tanaka, and A. Kato. (1987). Six chloroplast genes (ndhA-F) homologous to human mitochondrial genes encoding components of the respiratory chain NADH dehydrogenase are actively expressed: determination of the splice sites in ndhA and ndhB pre-mRNAs. *Mol Gen Genet.* **210(3)**:385-93.:385-393.





- Matsuzaki, K., O. Murase, N. Fujii, and K. Miyajima.** (1995b). Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry*. **34**:6521-6.
- Matsuzaki, K., O. Murase, and K. Miyajima.** (1995a). Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers. *Biochemistry*. **34**:12553-9.
- Matteoni, R., and T. Kreis.** (1987). Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell. Biol.* **105**:1253-1265.
- Matthews, K.R., C. Tschudi, and E. Ullu.** (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Gen. Dev.* **8**:491-501.
- McCabe, R.E., J.S. Remington, and F.G. Araujo.** (1984). Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **46**:372-6.
- Meirelles, M.N.L., J.T.C. Araujo, and W. De Souza.** (1982). Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. *Z. Parasitenkd.* **68**:7-14.
- Meirelles, M.N.L., and W. De Souza.** (1983). Interaction of lysosomes with endocytic vacuoles in macrophages simultaneously infected with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **17**:327-334.
- Mellman, Y., R. Fuchs, and A. Helenius.** (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **55**:663-700.
- Milder, R., and J. Kloetzel.** (1980). The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages in vitro: interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitology*. **80**:139-145.
- Ming, M., M. Chuenkova, E. Ortega-Barria, and M.E. Pereira.** (1993). Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. *Mol Biochem Parasitol.* **59**:243-52.
- Ming, M., M.E. Ewen, and M.E. Pereira.** (1995). Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell.* **82**:287-96.
- Moore, P., K. Bose, S. Rabkin, and B. Strauss.** (1981). Sites of termination of in vitro DNA synthesis on ultraviolet- and N-acetylaminofluorene-treated phi X174 templates by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**:110-4.
- Mordue, D.G., and L.D. Sibley.** (1997). Intracellular fate of vacuoles containing *T. gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J. Immunol.* **159**:4452-4459.
- Moreno, S.N., J. Silva, A.E. Vercesi, and R. Docampo.** (1994a). Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J Exp Med.* **180**:1535-40.
- Moro, A., F. Ruiz-Cabello, A. Fernandez-Cano, R.P. Stock, and A. Gonzalez.** (1995). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. *Embo J.* **14**:2483-90.
- Mortara, R.A.** (1991). *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp Parasitol.* **73**:1-14.



- Moulder, J.W.** (1985). *Microbiol. Rev.* . **49**:298-337.
- Muhich, M., and J. Boothroyd.** (1988). Polycistronic transcripts in Trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in RNAm synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **8**:3837-3846.
- Munro, S.** (2002). Organelle identity and the targeting of peripheral membrane proteins. *Current Opinion in Cell Biology.* **14**:506-514.
- Nathan, C.F., N. Nogueira, J. Ellis, and Z. Cohn.** (1979). Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* **149**:1056-1068.
- Nazareth, M., and L. Meirelles.** (1986). Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur. J. Cell. Biol.* **41**:198.
- Neidhardt, F.C., and T.A. Philips.** (1984). The protein catalog of *Escherichia coli* in two dimensional gel electrophoresis of proteins. *Methods and Applications. Celis, J.E and Bravo, R. (eds). Orlando. Academic Press, Inc*:417-444.
- Neira, I., A.T. Ferreira, and N. Yoshida.** (2002). Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Int J Parasitol.* **32**:405-14.
- Nichitta, C.V.** (2002). A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER. *Current Opinion in Cell Biology.* **14**:412-416.
- Nogueira, N., and Z.A. Cohn.** (1976). *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* **143**:1402-1420.
- Noronha, F.S.M., F.J. Ramalho-Pinto, and M.F. Horta.** (1994). Identification of a putative pore-forming hemolysin active at acid pH in *Leishmania amazonensis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**:477-482.
- Noronha, F.S., J.S. Cruz, P.S. Beirao, and M.F. Horta.** (2000). Macrophage damage by *Leishmania amazonensis* cytotoxin: evidence of pore formation on cell membrane. *Infect Immun.* **68**:4578-84.
- Noronha, F.S., F.J. Ramalho-Pinto, and M.F. Horta.** (1994). Identification of a putative pore-forming hemolysin active at acid pH in *Leishmania amazonensis*. *Braz J Med Biol Res.* **27**:477-82.
- Noronha, F.S., F.J. Ramalho-Pinto, and M.F. Horta.** (1996). Cytolytic activity in the genus *Leishmania*: involvement of a putative pore-forming protein. *Infect Immun.* **64**:3975-82.
- Norris, K.A.** (1998). Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect Immun.* **66**:2460-5.
- Nozaki, T., and G.A. Cross.** (1994). Functional complementation of glycoprotein 72 in a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72 null mutant. *Mol Biochem Parasitol.* **67**:91-102.
- Nozaki, T., and G.A. Cross.** (1995). Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **75**:55-67.

- Ojcius, D.M., and D.-E. Young. (1990). A role for pore-forming proteins in the pathogenesis by parasites? *Parasitology Today*. **6**:163-5.
- Ojcius, D.M., and J.D. Young. (1991). Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem Sci*. **16**:225-9.
- Oliveira, M.M., E.D. Rocha, E. Rondinelli, A.V. Arnholdt, and J. Scharfstein. (1993). Signal transduction in *Trypanosoma cruzi*: opposite effects of adenylcyclase and phospholipase C systems in growth control. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **124**:91-99.
- Opperdoes, F.R. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:127-151.
- Opperdoes, F.R., and P.A.M. Michels. (1991). The evolutionary origin of glycosomes. *Parasitology Today*. **7**:105-109.
- Ortega-Barria, E., and M.E. Pereira. (1991). A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*. **67**:411-21.
- Osuna, A., F. Gamarro, S. Castanys, and L. Ruiz-Perez. (1986). Inhibition of lysosomal fusion by *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages. *International Journal for Parasitology*. **16**:629-632.
- Ouaissi, A., J. Cornette, R. Schoneck, B. Plumas-Marty, A. Taibi, M. Loyens, and A. Capron. (1992). Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor-like activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Eur J Cell Biol*. **59**:68-79.
- Ouaissi, A., B. Vergnes, M. Borges, and E. Guilvard. (2000). Identification and molecular characterization of two novel *Trypanosoma cruzi* genes encoding polypeptides sharing sequence motifs found in proteins involved in RNA editing reactions. *Gene*. **253**:271-80.
- Pace, J., M.J. Hayman, and J.E. Galan. (1993). *Cell*. **72**:505-514.
- Pasion, S.G., G.W. Brown, L.M. Brown, and D.S. Ray. (1994). Periodic expression of nuclear and mitochondrial DNA replication genes during the trypanosomatid cell cycle. *J. Cell. Sci.* **107**:3515-3520.
- Pereira, J.B., R.V. da Cunha, H.P. Willcox, and J.R. Coura. (1990). [Development of chronic human chagas cardiopathy in the hinterland of the Paraiba State, Brazil, in a 4.5 year period]. *Rev Soc Bras Med Trop*. **23**:141-7.
- Pereira, M.E., K. Zhang, Y. Gong, E.M. Herrera, and M. Ming. (1996). Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. *Infect Immun*. **64**:3884-92.
- Perry, K., and N. Agabian. (1991). mRNA processing in the Trypanosomatidae. *Experientia*. **47**:118-28.
- Petry, K., and H. Eisen. (1989). Chagas disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitology Today*. **5**:111-116.
- Pimenta, P.F.P., W. De Souza, T. Souto-Padron, and P. Pinto da Silva. (1989). The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: a fracture flip, replica-staining label fracture survey. *Eur. J. Cell. Biol*. **50**:263-71.



- Pinna, L.** (1990). Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta*. **1054**:167-84.
- Piras, M.M., D. Henriquez, and R. Piras.** (1987). The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the in vitro penetration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells. *Mol Biochem Parasitol*. **22**:135-43.
- Piras, R., M.M. Piras, and D. Henriquez.** (1983). *Trypanosoma cruzi*-fibroblastic cell interactions necessary for cellular invasion. *Ciba Found Symp*. **99**:31-51.
- Pless, D.D., and W.J. Lennarz.** (1977). Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **74**:134-8.
- Podack, E.R., and J. Tschopp.** (1982). Circular polymerization of the ninth component of complement. *J. Biol. Chem*. **257**:15204-15212.
- Pollard, V.W., and S.L. Hadjuk.** (1991). *Trypanosoma equiperdum* minicircles encode three distinct primary transcripts which exhibit guide RNA characteristics. *Mol. Cell. Biol*. **11**:1668-1675.
- Pollard, V.W., S.P. Rohrer, E.F. Michelotti, K. Hancock, and S.L. Hadjuk.** (1990). Organization of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Cell*. **63**:783-790.
- Porcel, B.M., A.N. Tran, M. Tammi, Z. Nyarady, M. Rydaker, T.P. Urmenyi, E. Rondinelli, U. Pettersson, B. Andersson, and L. Aslund.** (2000). Gene survey of the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Genome Res*. **10**:1103-7.
- Portnoy, D.A., T. Chakraborty, W. Goebel, and P. Cossart.** (1992). *Infect. Immun*. **60**:1263-1267.
- Portnoy, D.A., P.S. Jacks, and D.J. Hinrichs.** (1988). Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocitogenes*. *J. Exp. Med*. **167**:1459-1471.
- Potter, M., and C.V. Nichitta.** (2000). Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem*. **275**:33820-33827.
- Potter, M., R. Seiser, and C. Nichitta.** (2001). Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends Cell Biology*. **11**:112-115.
- Procopio, D.O., S. da Silva, C.C. Cunningham, and R.A. Mortara.** (1998). *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol*. **90**:1-13.
- Provoda, C.J., and K.D. Lee.** (2000). Bacterial pore-forming hemolysins and their use in the cytosolic delivery of macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev*. **41**:209-21.
- Pruzanski, W., and P. Wadas.** (1991). Phospholipase A2: a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol. Today*. **12**:143-146.
- Ramirez, M.I., C. Ruiz Rde, J.E. Araya, J.F. Da Silveira, and N. Yoshida.** (1993). Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect Immun*. **61**:3636-41.
- Rao, A.G., O.M.Z. Howard, A.S. Whitehead, H.R. Colten, and J.M. Sodetz.** (1987). Complementary DNA and derived amino acid sequence of the  $\alpha$  subunit of the



- human complement protein C8: evidence for the existence of a separate  $\alpha$  subunit messenger RNA. *Biochemistry*. **26**:3556-3564.
- Ravdin, J.I., and R.L. Guerrant.** (1982). *Rev. Infect. Dis.* **4**:1185-1207.
- Rawn, J.D.** 1989. *Bioquímica*. 55-56 pp.
- Rdest, U.e.a.** (1991). *Int. J. Med. Microbiol.* **274**:471-474.
- Reche, P., R. Arrebola, A. Olmo, D.V. Santi, D. Gonzalez-Pacanowska, and L.M. Ruiz-Perez.** (1994). Cloning and expression of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **65**:247-58.
- Reddy, A., E. Caler, and N.W. Andrews.** (2001). Plasma membrane repair is mediated by  $Ca^{2+}$ -regulated exocytosis of lysosomes. *Cell.* **106**:157-169.
- Reed, S.G.** (1988). In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* **140**:4342-7.
- Reina-San-Martin, B., W. Degraeve, C. Rougeot, A. Cosson, N. Chamond, A. Cordeiro-Da-Silva, M. Arala-Chaves, A. Coutinho, and P. Minoprio.** (2000). A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med.* **6**:890-7.
- Revelard, P., S. Lips, and E. Pays.** (1993). Alternative splicing within and between alleles of the ATPase gene 1 locus of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **62**:93-102.
- Rikihisa, Y., and S. Ito.** (1979). *J. Exp. Med.* **150**:703-708.
- Robello, C., P. Navarro, S. Castanys, and F. Gamarro.** (1997). A pteridine reductase gene ptr1 contiguous to a P-glycoprotein confers resistance to antifolates in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **90**:525-35.
- Rodriguez, A., I. Martinez, A. Chung, C.H. Berlot, and N.W. Andrews.** (1999a). cAMP regulates  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes. *J Biol Chem.* **274**:16754-9.
- Rodriguez, A., M.G. Rioult, A. Ora, and N.W. Andrews.** (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol.* **129**:1263-73.
- Rodriguez, A., P. Webster, J. Ortego, and N.W. Andrews.** (1997). Lysosomes behave as  $Ca^{2+}$ -regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol.* **137**:93-104.
- Ropele, M., and G. Menestrina.** (1989). *Biochim. Biophys. Acta.* **985**:9-18.
- Ruiz, R.C., V.L. Rigoni, J. Gonzalez, and N. Yoshida.** (1993). *Parasite Immunol.* **15**:121-125.
- Ryan, K.A., S. Dasgupta, and S.M. Beverley.** (1993). Shuttle cosmid vectors for the Trypanosomatid parasite *Leishmania*. *Gene.* **131**:145.
- Sabatini, D.D., G. Kreibich, T. Morimoto, and M. Adesnick.** (1982). Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell Biol.* **92**:1-22.



- Sambrook, J., and M. Gething.** (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. **342**:224-5.
- Sansonetti, P.J., A. Ryter, P. Clerc, A.T. Maurelli, and J. Mounier.** (1986). Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: Lysis of the phagocytic vacuola and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect. Immun.* **51**:461-469.
- Santana, J.M., P. Grellier, J. Schrevel, and A.R. Teixeira.** (1997). A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J.* **325**:129-37.
- Sather, S., and N. Agabian.** (1985). A 5' spliced leader is added in trans to both alpha- and beta-tubulin transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-5467.
- Schenkman, R.P., F. Vandekerckhove, and S. Schenkman.** (1993a). Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **61**:898-902.
- Schenkman, S., N.W. Andrews, V. Nussenzweig, and E.S. Robbins.** (1988). *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell.* **55**:157-65.
- Schenkman, S., and D. Eichinger.** (1993c). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol. Today.* **9**:217-222.
- Schenkman, S., D. Eichinger, M.E. Pereira, and V. Nussenzweig.** (1994). Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol.* **48**:499-523.
- Schenkman, S., M.A. Ferguson, N. Heise, M.L. de Almeida, R.A. Mortara, and N. Yoshida.** (1993b). Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **59**:293-303.
- Schenkman, S., M.S. Jiang, G.W. Hart, and V. Nussenzweig.** (1991b). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* **65**:1117-25.
- Schenkman, S., and R.A. Mortara.** (1992). HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J Cell Sci.* **101**:895-905.
- Schenkman, S., E.S. Robbins, and V. Nussenzweig.** (1991a). Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect Immun.* **59**:645-54.
- Schrevel, J., A. Deguercy, R. Mayer, and M. Monsigny.** (1990). Proteases in malaria-infected red blood cells. *Blood Cells.* **16**:563-584.
- Schröder, W., and I. Moser.** (1997). *FEMS Microbiol. Letter.* **150**:141-147.
- Schürch, N., A. Hehl, E. Vasella, R. Braun, and R. I.;** (1994). Accurate polyadenylation of prociclyn mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol. Cell Biol.* **14**:3668-75.
- Schwartzman, J.D., and L.S. Saffer.** (1992). How *Toxoplasma* gets in and out of cells. *Intracellular parasites (Eds Harris, J. R. and Avila, J.L. Plenum, New York)*:333-364.



- Scott, D.A., R. Docampo, J.A. Dvorak, S. Shi, and R.D. Leapman.** (1997). In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **272**:28020-9.
- Shapira, M., and G. Pedraza.** (1990). Sequence analysis and transcriptional activation of heat shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol.* **42**:247-55.
- Shinkai, Y., K. Takio, and K. Okumura.** (1988). Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature.* **334**:525-527.
- Simpson, L.** (1973). Structure and function of kinetoplast DNA. *J Protozool.* **20**:2-8.
- Simpson, L., O.H. Thiemann, N. Savill, J.D. Alfonzo, and D.A. Maslov.** (2000). Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *PNAS.* **97**:6986-6993.
- Snary, D.** (1985). Receptors and recognition mechanisms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **79**:587-90.
- Soares, M.J., and W. de Souza.** (1991). Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* **77**:461-8.
- Soares, M.J., T. Souto-Padron, and W. De Souza.** (1992). Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci.* **102**:157-67.
- Sogin, M.L., H.J. Elwood, and J.H. Gunderson.** (1986). Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **83**:1383-91.
- Stuart, K.** (1991). RNA editing in mitochondrial mRNA of Trypanosomatids. *Trends Biochem. Sci.* **16**:68-73.
- Sturm, N.R., and L. Simpson.** (1990). Kinetoplastid DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell.* **61**:879-884.
- Sugimura, K., and N. Higashi.** (1988). A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:3650-3654.
- Tanowitz, H., M. Wittner, Y. Kress, and B. Bloom.** (1975). Studies of in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. I. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. *Am J Trop Med Hyg.* **24**:25-33.
- Tardieux, I., M.H. Nathanson, and N.W. Andrews.** (1994). Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> transients. *J Exp Med.* **179**:1017-22.
- Tardieux, I., P. Webster, J. Ravesloot, W. Boron, J.A. Lunn, J.E. Heuser, and N.W. Andrews.** (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell.* **71**:1117-30.
- TDR. 2002. Strategic direction for research  
Disease burden and epidemiological trends.
- Telles, S., T. Abate, T.C. Slezynger, and D.A. Henriquez.** (1999). *Trypanosoma cruzi* and human ubiquitin are immunologically distinct proteins despite only three amino acid difference in their primary sequence. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **24**:123-30.



- Thomas, M.C., J.L. Garcia-Perez, C. Alonso, and M.C. Lopez. (2000). Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA Cell Biol.* **19**:47-57.
- Tilley, M., M.E. Fichera, M.E. Jerome, D.S. Roos, and M.W. White. (1997). *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuoles that is impermeable and contains only a subset of dense granule proteins. *Infect. Immun.* **65**:4598-4605.
- Todt, J.C., W.J. Rocque, and E.J. McGroarty. (1992). Effects of pH on bacterial porin function. *Biochemistry.* **31**:10471-8.
- Tomlinson, S., F. Vandekerckhove, U. Frevert, and V. Nussenzweig. (1995). The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology.* **110**:547-54.
- Towler, E.M., S.V. Gulnik, T.N. Bhat, D. Xie, E. Gustschina, T.R. Sumpter, N. Robertson, C. Jones, M. Sauter, N. Mueller-Lantzsch, C. Debouck, and J.W. Erickson. (1998). Functional characterization of the protease of human endogenous retrovirus, K10: can it complement HIV-1 protease? *Biochemistry.* **37**:17137-44.
- Uemura, H., S. Schenkman, V. Nussenzweig, and D. Eichinger. (1992). Only some members of a gene family in *Trypanosoma cruzi* encode proteins that express both trans-sialidase and neuraminidase activities. *Embo J.* **11**:3837-44.
- Urbina, J.A. (1994). Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today.* **10**:107-110.
- Van der Ploeg, L.H. (1986). Discontinuous transcription and splicing in trypanosomes. *Cell.* **33**:77-84.
- Van der Ploeg, L.T., A.W.C.A. Cornelissen, J.D. Barry, and P. Borst. (1984). The chromosomes of Kinetoplastida. *EMBO J.* **3**.
- Vasella, E., R. Braun, and I. Roditi. (1994). Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes? *Nucleic Acids Research.* **22**:1359-1364.
- Vermelho, A.B., E.B. Bergter, M.C. Pereira, and M.N. de Meirelles. (1992a). Glycolipid and protein profiles of normal and *Trypanosoma cruzi* infected heart muscle cells. *Acta Trop.* **52**:17-25.
- Villalta, F., and F. Kierszenbaum. (1983). Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta.* **736**:39-44.
- Villalta, F., and F. Kierszenbaum. (1984). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues. *Biochem Biophys Res Commun.* **119**:228-35.
- Villalta, F., and F. Kierszenbaum. (1985). Role of N-acetyl-glucosamine residues on host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta.* **834**:216-222.
- Villalta, F., M.F. Lima, S.A. Howard, L. Zhou, and A. Ruiz-Ruano. (1992). Purification of a *Trypanosoma cruzi* trypomastigote 60-kilodalton surface glycoprotein that primes and activates murine lymphocytes. *Infect Immun.* **60**:3025-32.
- Villalta, F., C.M. Smith, A. Ruiz-Ruano, and M.F. Lima. (2001). A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. *FEBS Letters.* **505**:383-388.



- Wahle, E., and W. Keller. (1992). The biochemistry of 3' end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:419-440.
- Walder, J.A., P.S. Eder, D.M. Engman, S.T. Brentano, R.Y. Walder, D.S. Knutzon, D.M. Dorfman, and J.E. Donelson. (1986). The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. *Science*. **233**:569-71.
- Walker, T.S., and H.H. Winkler. (1978). *Infect. Immun.* **22**:200-208.
- Walter, P., R. Gilmore, and G. Blobel. (1984). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell*. **38**:5-8.
- Warhurst, D.C. (1985). *Parasitology Today*. **1**:24-28.
- Warren, G. (1985). Membrane traffic and organelle division. *Trends Biochem. Sci.* **10**:439-443.
- Wilkowsky, S.E., M.A. Barbieri, P.D. Stahl, and E.L. Isola. (2002). Regulation of *Trypanosoma cruzi* invasion of nonphagocytic cells by the endocytically active GTPases dynamin, Rab5, and Rab7. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**:516-21.
- Wilkowsky, S.E., M.J. Wainszelbaum, and E.L. Isola. (1996). *Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular Ca<sup>2+</sup> during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* **222**:386-9.
- Wootton, J.C., and S. Federhen. (1996). Analysis of compositionally biased regions in sequence databases. *Methods Enzymol.* **266**:554-71.
- Yoshida, N., M.L. Dorta, A.T. Ferreira, M.E. Oshiro, R.A. Mortara, A. Acosta-Serrano, and S. Favoreto Junior. (1997). Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Mol Biochem Parasitol.* **84**:57-67.
- Yoshida, N., S. Favoreto, Jr., A.T. Ferreira, and P.M. Manque. (2000). Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J Med Biol Res.* **33**:269-78.
- Young, J.D., and Z.A. Cohn. (1985). Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by *Entamoeba histolytica*: characterization of a pore-forming protein (PFP). *J Cell Biochem.* **29**:299-308.
- Young, J.D., and D.M. Lowrey. (1989). Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem.* **264**:1077-83.
- Young, J.D., T.M. Young, L.P. Lu, J.C. Unkeless, and Z.A. Cohn. (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* **156**:1677-90.
- Zaidenberg, A., H.A. Tournier, G.R. Schinella, and H.O. Buschiazco. (2000a). [*Trypanosoma cruzi*: obtaining extracellular amastigotes and studying their development under different culture conditions]. *Rev Latinoam Microbiol.* **42**:21-6.
- Zaidenberg, A., H.A. Tournier, G.R. Schinella, and H.O. Buschiazco. (2000b). *Trypanosoma cruzi*: obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* **42**:21-26.



- Zhong, L., H.G. Lu, S.N. Moreno, and R. Docampo. (1998).** Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by *Trypanosoma cruzi* is linked to cell invasion. *FEMS Microbiol Lett.* **161:15-20.**
- Zichilinsky, A.e.a. (1994).** *Mol. Microbiol.* **11:619-627.**
- Zingales, B., and W. Colli. (1985).** *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **117:129-152.**
- Zingales, B., A.M. Katzin, M.V. Arruda, and W. Colli. (1985).** Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization into mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol.* **16:21-34.**
- Zwierzynski, T.A., and G.A. Buck. (1990).** In vitro capping in *Trypanosoma cruzi* identifies and shows specificity for the spliced leader RNA and U-RNAs. *Nucleic Acids Res.* **18:4197-206.**



Biblioteca Universitaria de Granada



01053401