



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE
INTERACCIONAN CON UNA PROTEÍNA DE *Trypanosoma
evansi* QUE PRESENTA HOMOLOGÍA CON LA
SUBUNIDAD REGULADORA DE LA PROTEÍNA QUINASA
DEPENDIENTE DE AMP CÍCLICO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la Bachiller Victoria Helena
Navas Gil como requisito parcial para
optar al título de Licenciada en Biología

Tutores: Dr. José Bubis

Dr. Juan Carlos Martínez

Asesora Académica: Dra. Valentina Salas

CARACAS, VENEZUELA

OCTUBRE-2012

DEDICATORIA

Son muchos a los que les quiero dedicar este gran momento, pero especialmente a Alberto Navas. Papá, nada, pero nada de esto hubiese sido posible sin tu apoyo, sin tu ayuda, sin tus consejos, sin tus regaños, sin tus cuidados, sin tu amor incondicional. Gracias a ti, he logrado llegar hasta este punto, el cual estoy muy feliz de haber alcanzado. A mi mamá, Doris de Navas, que siempre estás conmigo, mi mejor amiga y guía, la mejor persona del mundo, este logro es para ti.

Al ser con quien más peleo, pero a la vez no sabría que hacer sin ella, Grauben Navas, eres mi norte, siempre estas allí para mí, sin importar nada sé que cuento contigo. A José Manuel Pereira, gracias por tu apoyo y paciencia, por convertirte en mi hermano. Al tremendo de la casa, Lucas Pereira, eres luz para mí, además de mi sobrino, eres mi hermano menor. Al que aun no conocemos el nombre, Alias Copita, otro pequeñito ser que viene al mundo a volverme más loca y feliz.

A mis abuelos: Doris, Pedro, Asisclo y especialmente a mi abuela Laura, por ser el viento y ese hermoso pajarito que me acompaña y me cuida en todo momento y me brinda alegría y fortaleza en momentos de debilidad. A Trina Navas, te admiro por todo lo que eres, ¿qué seríamos sin ti?

A los que aquellos llaman la familia que uno escoge: María Marrero, Rossana Mendoza y Farilyn Vivas, por siempre estar conmigo, en las buenas y en las malas, por tenerme paciencia y siempre darme ánimos. A Luis Faria, por darle este hermoso e increíble giro a mi vida, por siempre encontrar la manera de hacerme sonreír ante cualquier circunstancia, por siempre acompañarme y darme apoyo para seguir adelante.

A Dios, gracias por todo, en especial por crear un mundo que lo pueda percibir a través de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Muchísimas gracias a mis tutores, al Dr. José Bubis y al Dr. Juan Carlos Martínez, por su inmensa paciencia, por enseñarme y orientarme. Son increíbles personas y un excelente modelo a seguir, no consigo palabras para expresarles lo que me alegra que fueran ustedes los que me hayan ayudado a cumplir este requisito, de verdad, gracias.

Un gran agradecimiento a Floritza Bustamante, quien me enseñó, me ayudó y me dio la bienvenida al trabajo en el laboratorio. Gracias a Emiliana Mendoza, por su ayuda en el laboratorio, así como a acortar las distancias entre el laboratorio a mi hogar. Gracias a Jennifer Sánchez, a Leonardo Escalona, a Carlos Sanz, a Nelson Araujo, a la Dra. Mary Isabel Gonzatti, por sus orientaciones y recomendaciones. Así como muchísimas gracias a todo el personal del IDEA, excelentes personas, en especial a Yuryanni, Estluz, Ingrid, Joilyneth, Isabel, Liliana, Rafael y Kathleen. Gracias al bioterio de la USB, y a los animales de experimentación, perdónenme, espero que pronto exista un medio axénico para *Trypanosoma evansi*.

A la Dra. Guillermina Alonso, por sus sabios consejos, por siempre literalmente salvarme la vida en momentos difíciles. A la Dra. Cristina Sanoja y al Dr. Gilberto Payares, grandes profesores, gracias por enseñarme y orientarme en el mundo de la parasitología.

A los amigos de mi papá, al Prof. Guillermo Durand y al Decano Piero LoMonaco, por prestarme su apoyo y ayuda cuando salía tarde de la Universidad.

A la UCV, la casa que vence las sombras, muchísimas gracias por esta hermosa experiencia que comenzó hace cinco años.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 <i>Trypanosoma evansi</i>	3
1.1.1 Filogenia y morfología	4
1.1.2 Ciclo de vida	6
1.1.3 Sintomatología, patogénesis y patología	7
1.1.4 Hechos biológicos inusuales	8
1.1.5 Terapia de drogas farmacéuticas en contra de <i>Trypanosoma evansi</i>	10
1.2 El AMPc como una de las moléculas más conservadas en las rutas de transducción de señales en organismos eucarióticos	11
1.2.1 El AMPc en tripanosomatidios	12
1.2.1.1 Las adenilato ciclasas y las fosfodiesterasas en tripanosomatidios	13
1.2.1.1.1 Las adenilato ciclasas	14
1.2.1.1.2 Las fosfodiesterasas	15
1.3 Las proteínas quinasas dependientes de AMPc	16
1.3.1 Las proteínas quinasas dependientes de AMPc en organismos eucarióticos superiores ..	16
2. ANTECEDENTES	20
2.1 Las proteínas quinasas en los tripanosomatidios	20
2.1.1 Una proteína de <i>Trypanosoma evansi</i> que presenta homología con la subunidad reguladora de las PKAs de eucariotas superiores	22

3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Expresión en <i>Escherichia coli</i> M15 [pREP4] de la proteína recombinante de <i>Trypanosoma evansi</i> que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos	26
4.2 Purificación de la proteína recombinante de <i>Trypanosoma evansi</i> que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos	28
4.3 Digestión parcial de la proteína recombinante de interés mediante proteasas	30
4.4 Purificación de <i>Trypanosoma evansi</i>	32
4.5 Ensayo de interacción proteína – proteína	33
4.6 Técnicas empleadas para el análisis de las experiencias realizadas	35
4.6.1 Corridas electroforéticas en geles de SDS- poliacrilamida	35
4.6.2 Western blot	36
4.6.3 Cuantificación de proteína mediante la técnica colorimétrica de Bradford	37
5. RESULTADOS	39
5.1 Expresión en <i>Escherichia coli</i> M15 [pREP4] de la proteína recombinante de <i>Trypanosoma evansi</i> que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos	39
5.2 Purificación de la proteína recombinante de <i>Trypanosoma evansi</i> que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos	46
5.3 Digestión parcial de la proteína recombinante de interés mediante proteasas	50

5.4 Purificación de parásitos de <i>Trypanosoma evansi</i>	52
5.5 Ensayo de interacción proteína – proteína	53
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	57
7. CONCLUSIONES	64
8. BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación taxonómica de <i>Trypanosoma evansi</i>	4
Figura 2: <i>Trypanosoma evansi</i> visto en un microscopio óptico, teñido con Giemsa	5
Figura 3: Ciclo de vida de <i>T. evansi</i>	6
Figura 4: Posibles rutas de transmisión/infección de <i>Trypanosoma evansi</i> a través de los mamíferos en el sur de Pantanal en Brasil	7
Figura 5: Estructura de las adenilato ciclasas en tripanosomatidios y mamíferos	14
Figura 6: Activación de la proteína quinasa dependiente de AMPC	18
Figura 7: Dominios de interacción presentes en la subunidad reguladora de la PKA de organismos eucarióticos superiores	19
Figura 8: Dominios de interacción presentes en una proteína de <i>Trypanosoma evansi</i> que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos. Secuencias nucleotídicas y de residuos de aminoácidos en los posibles dominios de enlazamiento de nucleótidos cíclicos	23
Figura 9: Esquema comparativo del tamaño y de los dominios presentes en la subunidad R de mamíferos con la proteína en <i>Trypanosoma evansi</i> que presenta homología con dicha subunidad R en mamíferos	24
Figura 10: Expresión de la proteína recombinante de interés a 37 °C	39
Figura 11: Análisis de la cinética de la expresión a 16 °C de la proteína recombinante de interés	40
Figura 12: Perfil proteico del lisado celular de <i>E. coli</i> M15 antes y luego de inducir la expresión de la proteína de <i>Trypanosoma evansi</i> que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos recombinante	42
Figura 13: Efecto de distintos procedimientos empleados para el lisado celular	43

Figura 14: Efecto de la solución de lisis empleado durante el lisado celular	44
Figura 15: Efecto de la sonicación durante el lisado celular	45
Figura 16: Análisis de la purificación de la proteína recombinante de interés mediante cromatografía de afinidad	47
Figura 17: Intento de mejorar la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de intercambio aniónico	49
Figura 18: Concentración por ultrafiltración de la proteína recombinante a partir de las fracciones recolectadas durante la cromatografía de afinidad	50
Figura 19: Análisis de la digestión parcial de la proteína recombinante con distintas relaciones entre proteasa:proteína	51
Figura 20: Análisis del ensayo de interacción proteína-proteína realizado con la fracción soluble del parásito	54
Figura 21: Análisis del ensayo de interacción proteína-proteína realizado con la fracción particulada del parásito	55
Figura 22: Análisis del ensayo de interacción proteína-proteína mediante inmunotinción	56

ABREVIATURAS

ACs	Adenilato Ciclasas
AKAPs	Proteínas de anclaje de las PKAs
AMPc	Adenosin 3', 5' monofosfato cíclico
C	Catalítica
DEAE	Éter de DiEtilAmino
EDTA	Ácido EtilenDiaminoTetraAcético
EGTA	Ácido EtilenGlicolTetraAcético
GMPC	Guanosin 3', 5' monofosfato cíclico
IPTG	Isopropil- β -D-1 TioGalactoPiranósido
Medio LB	Medio Luria-Bertani
Medio YT	Medio Triptona con Extracto de Levadura
NBB	Solución de enlazamiento en condiciones nativas (Native Binding Buffer)
PBS	Solución Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)
PBSG	Solución Fosfato Salino + Glucosa
PDEs	Fosfodiesterasas
PKA	Proteína Quinasa dependiente de AMPc (Protein Kinase dependent of AMPc)
PK	Proteína Quinasa (Protein Kinase)

R	Reguladora
SDS-PAGE	Geles de PoliAcrilamida con Docecil Sulfato de Sodio
TBS	Solución de Tris Salino
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. evansi</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>
VSGs	Proteínas Variantes de Superficie

RESUMEN

Trypanosoma evansi infecta a una diversa gama de animales mamíferos, siendo los equinos los más afectados, ocasionándoles una enfermedad parasitaria conocida en Venezuela como la peste boba. Esta tripanosomiasis compromete el estado de salud e incide en la mortalidad de estos seres vivos, así como puede poner en riesgo factores económicos vinculados al uso de animales infectados. Las drogas farmacéuticas existentes para su erradicación no han sido eficientes, así como tampoco han sido suficientes los esfuerzos realizados en pro del desarrollo de nuevas drogas. La elucidación de las rutas de transducción de señales puede ser una herramienta útil para la identificación de blancos terapéuticos que permitan la erradicación de enfermedades parasitarias a través de la obstrucción de dichas rutas.

El nucleótido adenosin 3', 5' monofosfato cíclico o AMPc, es una de las moléculas más conservadas en las rutas de transducción de señales en organismos eucarióticos, ya que regula una multitud de respuestas celulares a través de proteínas efectoras como las proteínas quinasas dependientes de AMPc o PKAs. En *T. evansi* se identificó una proteína que presenta homología con la subunidad reguladora de las PKAs de mamíferos, pero es incapaz de enlazar a nucleótidos cíclicos como el AMPc. Se ha sugerido que la región amino terminal de esta proteína pudiera estar involucrada en interacciones con otras proteínas, pudiendo estar asociada con el anclaje de las subunidades catalíticas putativas de *T. evansi* a los substratos que requieren ser fosforilados.

En este Trabajo Especial de Grado se planteó elucidar las posibles interacciones proteína-proteína que pudieran existir entre la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamífero y otras proteínas presentes en el parásito. Para ello, se determinaron las condiciones óptimas que permitieron la expresión en bacterias de la proteína de interés y de su purificación a homogeneidad. A su vez, se realizaron ensayos proteolíticos de la proteína de interés, en la que se obtuvo un patrón en el que se conservaron dos fragmentos proteolíticos de masas moleculares de 19,5 kDa y 49 kDa, sin embargo, no fue posible precisar la obtención exclusiva de sólo estos dos fragmentos. Así mismo se purificó al *T. evansi* de sangre de ratas, en el que se obtuvo la fracción soluble y particulada del parásito.

A través de métodos cromatográficos con resinas acopladas a iones de níquel, se determinaron los enlazamientos ocurridos en la proteína de interés con otras proteínas presentes en el parásito. En estos ensayos se identificaron las masas moleculares aparentes de las proteínas que interaccionaron con

la proteína de estudio. Se determinó que las proteínas presentes en la fracción soluble del parásito de masas: 46 kDa, 44,6 kDa, 37,6 kDa; así como masas de menor intensidad de: 80,6 kDa, 63 kDa, 32,5 kDa, 28,2 kDa 26,6 kDa y 20 kDa, se enlazaron con la proteína de interés. Mientras que las proteínas presentes en la fracción particulada del parásito de masas: 35,5 kDa, 40 kDa, 40,9 kDa y 42,2 kDa se enlazaron con la proteína de interés. En comparación con otros estudios realizados, se puede plantear la capacidad de la proteína de estudio de enlazar a la subunidad catalítica putativa, sirviendo como anclaje de los substratos a ser fosforilados por ésta, así como puede estar interaccionando con proteínas como ATPasas, acuaporinas o hexoquinasas putativas, que requieren ser fosforiladas. Estas evidencias corroboran lo planteado con respecto a la función asociada de la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamífero.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Trypanosoma evansi*

La tripanosomiasis es una de las enfermedades parasitarias epidemiológicamente importantes debido a su preocupante potencial de infección en diversos animales mamíferos y su amplia distribución en las regiones tropicales y sub-tropicales en el mundo. Los síndromes ocasionados por estos parásitos suelen ser de alto riesgo, ya que comprometen el estado de salud e inciden en las tasas de mortalidad de los animales infectados. También pueden ejercer un efecto negativo en términos económicos, por las pérdidas que ocurren en aquellas entidades dependientes del uso de animales mamíferos que pueden estar potencialmente infectados (Simano y col., 2010).

En 1881, Griffith Evans describió la presencia de *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) en sangre de equinos y camellos. Este fue el primer tripanosomatidio patogénico en ser descrito en la historia (Hoare, 1972). *T. evansi* es el agente etiológico de un tipo de tripanosomiasis animal conocido comúnmente como “Surra”, y en Venezuela como “Derrengadera equina” o “la peste boba”. Esta infección parasitaria tiene una amplia distribución geográfica, encontrándose especialmente en regiones de temperaturas cálidas y elevadas (Hoare, 1972). Este parásito hemoflagelado infecta con particular gravedad a caballos, camellos, dromedarios, elefantes y animales domésticos como perros. También causa una infección sub-clínica en bovinos, cabras, ovejas, venados y cerdos. En Venezuela se han descrito como reservorios al chigüire (*Hydrochaeris hydrochaeris*) y al murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*), (Hoare, 1972; Canelón y Meléndez, 2003). El hombre no es un hospedador típico, aunque para el año 2004 se reportó en la India el primer caso de infección de *T. evansi* en humanos (Vanhollebeke y col., 2006), lo que sugiere que esta enfermedad tiene potencial de convertirse en una enfermedad zoonótica. Los que reportaron este caso clínico consideraron que la causa de la infección se debió a la ausencia de la apolipoproteína L-1 en el suero del paciente, la cual le confiere al hombre su inmunidad natural contra

este tripanosomatidio. La carencia de esta proteína se debió a mutaciones presentes en el gen que la codifica, la apoL-1 (Vanhollebeke y col., 2006).

1.1.1 Filogenia y morfología

T. evansi se encuentra clasificado dentro del orden Kinetoplastida (ver figura 1), el cual incluye a protozoarios flagelados con características particulares como: 1) edición del ARN, que permite la expresión de genes mitocondriales; 2) una arquitectura concatenada de maxi- y mini- círculos de ADN organizados en el mitocondrion, designada como quinetoplasto, la cual forma la base flagelar; 3) transcripción policistronica, seguido de un proceso de “trans-splicing” que regula la traducción génica; 4) la compartimentalización de la glicólisis; 5) la evasión de la respuesta inmune del hospedador por la presencia de glicoproteínas variables de superficie (VSGs) (Simpson y col., 2006).

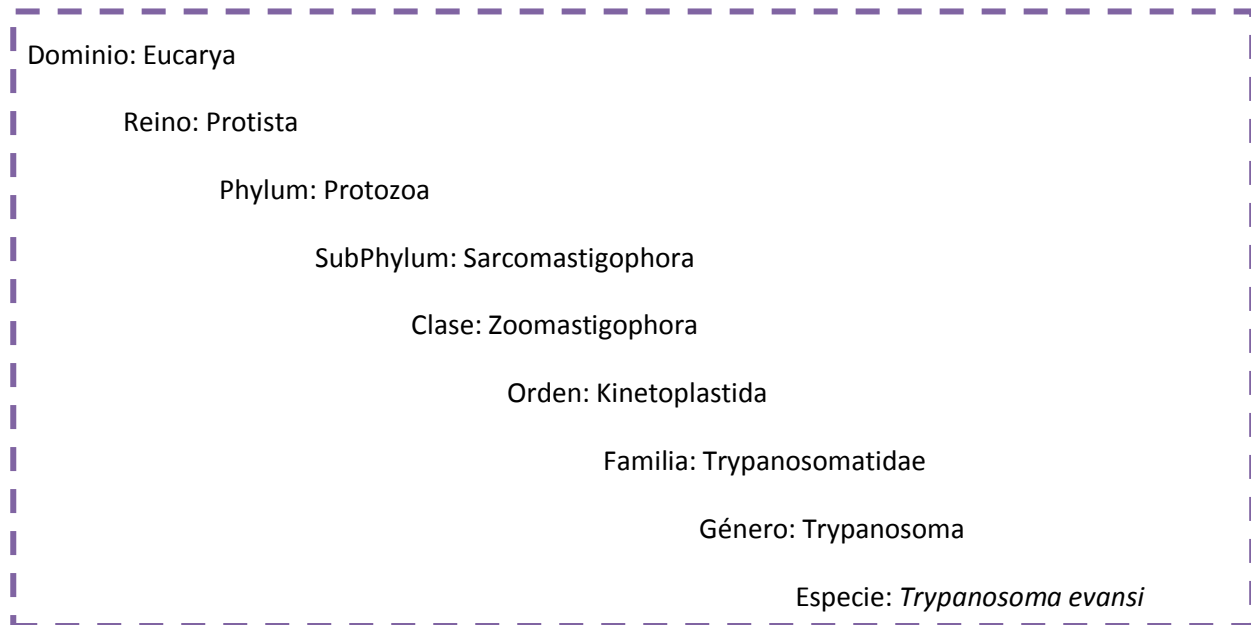


Figura 1: Clasificación taxonómica de *Trypanosoma evansi*. Tomado de: Nino (Ed.) y col., Parasitología, Universidad de Carabobo, 1996.

Se ha asumido que *T. evansi* posee en todo su ciclo de vida un único tipo de morfología (Hoare, 1972), siendo de tipo tripomastigote, que se caracteriza por contener el quinoplasto en el extremo posterior, del cual se origina el flagelo, que recorre el cuerpo del tripanosomatidio como membrana ondulante y se torna flagelo libre en su extremo anterior (como se muestra en la figura 2). Sin embargo, se han descrito variantes de esta morfología (González, 2001). El parásito presenta dos morfotipos: 1) Un morfotipo esférico del tripomastigote, el cual ocurre durante la fase patente de la parasitemia, existiendo cuando el tripanosomatidio está poco adaptado a los factores propios del hospedador que lo someten a estrés; 2) durante la fase tardía de la parasitemia se describe un morfotipo más alargado, el cual constituye una fase próspera evolutiva, lo que también ocasiona la disminución de los recursos y, junto con la respuesta del sistema inmune del hospedador, da inicio a una competencia intraespecífica. Se ha sugerido que la diversidad de morfotipos existentes ocasiona heterogeneidad de las respuestas producidas como mecanismos de adaptación. La diversidad de respuestas o “estrategias de vida”, se deben a la plasticidad genómica de *T. evansi* (González, 2001).

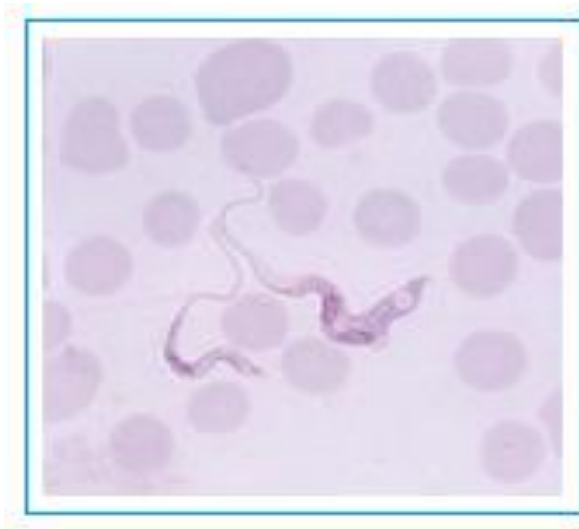


Figura 2: *Trypanosoma evansi* visto en un microscopio óptico, teñido con Giemsa.

Tomado de: <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/ganaderia/equinos/enfermedades/tripanosomosis.htm>.

[Consulta: 22 de Noviembre de 2011]

1.1.2 Ciclo de vida

La transmisión de *T. evansi* ocurre a través de insectos hematófagos, conocidos comúnmente como tabánidos. En el insecto vector no ocurre desarrollo de este tripanosomatidio. Sin embargo, cuando el insecto ingiere sangre de un hospedador infectado, los parásitos presentes en los restos de sangre en su aparato bucal pueden ser transmitidos mecánicamente cuando el insecto vuelve a alimentarse de otro hospedador. Los tripanosomatidios pueden ingresar a través de la picadura si no ha coagulado la sangre en la que se encuentran. Dentro del torrente sanguíneo del hospedador, el tripanosomatidio no invade célula alguna y se divide por medio de fisión binaria longitudinal. En la figura 3, se representa el ciclo de vida de *T. evansi*.

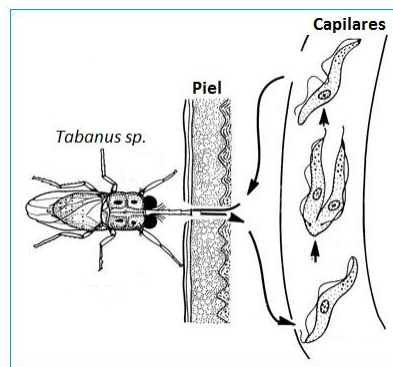


Figura 3: Ciclo de vida de *T. evansi*. Tomado de: <http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/womack/index.php> con modificaciones [Consulta: 22 de Noviembre de 2011].

Un estudio realizado en Brasil, revela que la infección de los animales con *T. evansi* en la región sur de Pantanal ocurre por medio de un mecanismo de transmisión trófica, es decir, una red de conexión alimenticia permite la dispersión del parásito dentro de una comunidad, como se representa en la figura 4. Este es otro mecanismo eficiente para la dispersión y permanencia de esta enfermedad dentro una comunidad (Herrera y col., 2011).

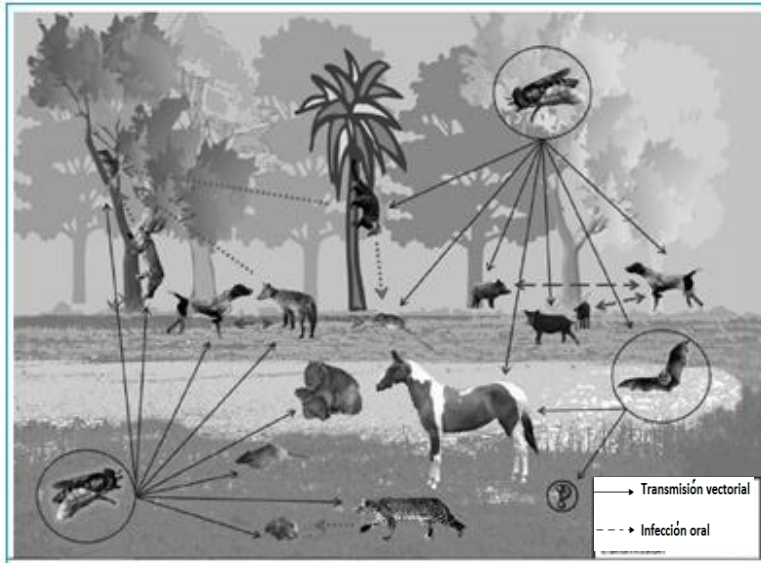


Figura 4: Posibles rutas de transmisión/infección de *Trypanosoma evansi* a través de los mamíferos en el sur de Pantanal en Brasil. Tomado de: Herrera y colaboradores, 2001.

1.1.3 Sintomatología, patogénesis y patología

La enfermedad, asociada con el incremento de la parasitemia de *T. evansi* en los hospedadores, se manifiesta con el siguiente cuadro sintomatológico: fiebre, desarrollo progresivo de anemia, pérdida de peso, debilidad y edemas. La enfermedad suele durar meses o pocos años, hasta que ocurre la muerte del hospedador (Mahmoud y Gray, 1980).

Durante el seguimiento clínico de una infección de una yegua con *T. evansi*, se observaron anomalías neurológicas severas (por medio de movimientos involuntarios de sus ojos y cuerpo, por ejemplo) debido a la presencia del parásito en el sistema nervioso central, el cerebelo y el tronco encefálico, junto con síntomas crónicos como la pérdida de peso, fiebre, letargo y debilidad debido a la inmunosupresión ocasionada. En conjunto con los análisis sanguíneos y bioquímicos, se diagnosticó en la yegua: anemia, linfocitosis, hipoproteinemia, hipoalbuminemia e hipercalcemia (Berlin y col., 2009).

La patogenia de la enfermedad ha sido descrita a través de investigaciones en las cuales se realizan infecciones experimentales y se estudian los cambios patológicos y las lesiones de los tejidos *post mortem* (Mahmoud y Gray, 1980). Estos reportes científicos describen la histopatología y la progresión clínica de la enfermedad.

En un estudio histopatológico realizado en la India con ratas del género *Bandicota bengalensis* infectadas con *T. evansi*, se observaron cambios inflamatorios, degenerativos y necróticos en órganos como el hígado, el corazón, el bazo, los pulmones y los riñones, así como un alargamiento de los capilares, lesiones hemorrágicas, un incremento de la fagocitosis y de la parasitemia, donde el hígado fue uno de los órganos más afectados (Biswas y col., 2001). El conjunto de estos daños irreversibles y degeneraciones en los distintos órganos produjeron la muerte de estos animales. En este trabajo argumentan que la sobrevivencia y la proliferación del parásito por fisión binaria en el plasma del torrente sanguíneo del hospedador inoculado y, posteriormente, en los tejidos y órganos del hospedador, es lo que da origen al desencadenamiento de la enfermedad (Biswas y col. 2001).

1.1.4 Hechos biológicos inusuales

Se ha sugerido que *T. evansi* y *Trypanosoma equiperdum* son sub-especies de *Trypanosoma brucei* (Lai y col., 2007). En estas sub-especies han ocurrido la pérdida de fragmentos de ADN de su quinetoplasto, a diferencia de *T. brucei*, el cual tiene su estructura concatenada de maxi- y mini- círculos. *T. evansi* se describe como un microorganismo aquinetoplastídico, ya que no tiene maxi-círculos y los mini-círculos se han homogenizado en su quinetoplasto, mientras que *T. equiperdum* es un microorganismo dikinetoplastídico, ya que aún conserva fragmentos de ADN de los maxi-círculos (Lai y col., 2007; Jensen y col., 2008). Se sugiere que la ocurrencia de cambios espontáneos en el quinetoplasto de *T. brucei*, los cuales fueron transmitidos de forma atípica en equinos, fue lo que generó

un curso evolutivo incapaz de culminar su desarrollo cíclico en las moscas tse-tse. Esto trajo como consecuencia que su transmisión fuese de forma mecánica inoculativa por otros vectores diferentes a las moscas tse-tse; y ocasionó la pérdida de su carácter pleomórfico, lo cual promovió su esparcimiento en otros continentes, además de África, dando curso de vida al *T. evansi* (Canelón y Meléndez, 2003; Jensen y col., 2008; Lai y col., 2008; Lun y col., 2010).

Si se considera a *T. evansi* como una sub-especie de *T. brucei*, se puede argumentar como otro hecho biológico inusual la organización de su genoma comparado con otros modelos eucarióticos (Daniels y col., 2010). *T. brucei* es un organismo diploide, formado por 11 pares de Megabases de cromosomas, 100 minicromosomas (de 30 a 150 kb) y cinco cromosomas de tamaño intermedio (200 a 900 kb), siendo los dos últimos aneuploides. La transcripción de genes y de ARN ocurre a través de tres ARN polimerasas, designadas como ARN I, II y III. La ARN polimerasa I transcribe genes que codifican las VSGs y la prociclina, mientras que la ARN polimerasa II transcribe genes que codifican para otras proteínas, la ARN polimerasa III transcribe genes no codificantes que actúan en la ejecución de otros procesos celulares (Daniels y col., 2010).

La regulación de la expresión génica en *T. evansi* se ha descrito como del tipo post-transcripcional (Haile y Papadopoulou, 2007). Una vez sintetizado el ARNm, ocurre su maduración a través de un proceso de “trans-splicing”, en el cual se transfiere en el extremo 5’ una secuencia designada como líder, ya que tiene el promotor que promueve la síntesis proteica, y en su extremo 3’ una secuencia de poliadenilación. Adicionalmente, se ha descrito la presencia de enzimas como los exosomas, las cuales regulan la transcripción génica. No obstante, poco se conoce sobre los mecanismos de regulación génica post-traducciona (Haile y Papadopoulou, 2007).

1.1.5 Terapia de drogas farmacéuticas en contra de *Trypanosoma evansi*

El tratamiento de la tripanosomiasis equina ocasionada por *T. evansi* se encuentra limitada a drogas como la suranina o la quinapiramina. Se ha descrito que el mecanismo de acción de la suranina pudiese estar dirigido a la inhibición de enzimas involucradas en señalización celular, como la glicerol 3-fosfato oxidasa y la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa; la quinapiramina modifica el enlazamiento normal de los ribosomas al ARNribosomal, por lo que disminuye la síntesis proteica (Ruiz y Guillén, 2005). Estas drogas son únicamente efectivas en la fase aguda inicial de la enfermedad y dejan una secuela de efectos secundarios en el animal infectado (Mahmoud y Gray, 1980).

Hasta los momentos, no se ha conseguido un tratamiento adecuado para la erradicación de esta enfermedad (Laxman y Beavo, 2007). La erradicación de estas enfermedades no ha sido posible, en gran medida porque son enfermedades limitadas a regiones tropicales o en países en vías de desarrollo, por lo que no existen los recursos ni el esfuerzo hacia el desarrollo de drogas eficientes, sólo se han realizado reformulaciones de las drogas ya existentes en la industria farmacéutica (Gould y de Koning, 2011).

1.2 El AMPc como una de las moléculas más conservadas en las rutas de transducción de señales en organismos eucarióticos

El nucleótido Adenosin 3', 5' monofosfato cíclico (AMPc) es un mensajero secundario ubicuo que regula una multitud de respuestas celulares en una amplia gama de organismos, que involucran desde las bacterias hasta los mamíferos, por lo que el AMPc es una de las moléculas más usadas en las rutas de transducción de señales. En eucariotas superiores, la formación del AMPc depende de la activación de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), los cuales utilizan a las proteínas G heterotrimétricas para activar a las enzimas denominadas adenilato ciclasas (ACs) que son responsables de sintetizar el AMPc a partir del ATP. Existe una variedad de proteínas efectoras capaces de enlazar el AMPc, tales como las proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKAs), los factores intercambiadores que son activados por AMPc (EPACs) y que activan a la proteína pequeña enlazadora de GTP, Rap 1, y los canales que enlazan AMPc (CNGCs) (Kopperud y col., 2003). Estas proteínas efectoras son las responsables de llevar a cabo las funciones de señalización del AMPc que incluyen el control del metabolismo, la transcripción génica y la actividad de algunos canales iónicos, entre otras. Adicionalmente, existe una variedad de enzimas denominadas fosfodiesterasas (PDEs) que se encargan de hidrolizar al AMPc y de terminar las rutas de señalización activadas por este mensajero secundario.

El estudio de las rutas de transducción de señales ha sido muy importante para la farmacología moderna (Naula y Seebeck, 2000) ya que, al conocerlas, se pueden identificar blancos terapéuticos potenciales que permitan la erradicación de enfermedades mediante la inhibición y posterior obstrucción de dichas rutas de señalización. De esta forma, se han podido identificar en humanos blancos terapéuticos de enfermedades como el asma, a través del estudio de la señalización celular mediada por el AMPc. En tripanosomatidios, sin embargo, no se han desarrollado drogas terapéuticas

mediante la interferencia de estas rutas (Naula y Seebeck, 2000; Shalaby y col., 2001; Laxman y Beavo, 2007).

1.2.1 El AMPc en tripanosomatidios

Si bien existen líneas de investigación que buscan elucidar las rutas de transducción de señales en tripanosomatidios, muy poco es lo que se conoce sobre las enzimas y los mecanismos asociados a estas rutas. Esto se debe en gran medida a que se ha asumido que los mecanismos y los efectos de estas rutas son réplicas de las rutas observadas en las células de mamíferos, las cuales ya han sido caracterizadas bioquímicamente. Mediante la secuenciación de los genomas, se ha comprobado que los componentes de las rutas de transducción de señales en tripanosomatidios no son totalmente iguales a los ya establecidos (Seebeck y col., 2004; Gould y de Koning, 2011).

La primera evidencia que demostró que el AMPc también es un mensajero secundario que regula numerosos eventos celulares en tripanosomatidios, fue la determinación de los cambios de la concentración intracelular del AMPc durante las diferentes fases del ciclo de vida en *Trypanosoma lewisi* (Strickler y Patton, 1975, Gould y de Koning, 2011) y en *T. brucei* (Mancini y Patton, 1981). Por ejemplo, en *T. brucei*, se determinaron los cambios del contenido intracelular del AMPc durante su crecimiento en ratas infectadas (Mancini y Patton, 1981). Estos científicos mostraron que durante el incremento de la parasitemia en ratas a un orden de 10^9 parásitos/mL, había una predominancia de una morfología alargada o de tipo “slender” en los tripanosomatidios presentes y cuantificaron que el AMPc intracelular también incrementó de 30 a 90 pmol. Cuando ocurrió el descenso del pico de parasitemia, los investigadores determinaron que también disminuyó la cantidad de AMPc intracelular a niveles basales y encontraron un mayor porcentaje de la morfología rechoncha o de tipo “stumpy” en los tripanosomatidios presentes. Con estos resultados, estos investigadores sugirieron el rol de la

regulación del AMPc en la diferenciación celular de *T. brucei*, así como sugieren que estos cambios de la concentración intracelular del AMPc son un reflejo de la elevada actividad metabólica que ocurre durante la proliferación de estos parásitos, en contraposición con la forma tipo “stumpy” en la que no ocurre la proliferación (Mancini y Patton, 1981; Gould y de Koning, 2011).

En un trabajo científico publicado por Seebeck y colaboradores (2004), los autores manifiestan que si bien existen mecanismos que son regulados por el AMPc en los tripanosomatidios, se ha obviado el hecho de que esta molécula conserva en su estructura bioquímica un elevado contenido energético, similar incluso a la energía libre presente en la molécula de ATP: la hidrólisis del enlace 3' del AMPc es de -11,9 kcal/mol de energía libre, mientras que la hidrólisis de los enlaces β , γ del ATP es de -8,9 kcal/mol. Es por ello, que estos autores sugieren que la hidrólisis del AMPc puede ser aprovechada a nivel celular también como una fuente energética en aquellas reacciones que requieren energía.

Si bien se ha demostrado la importancia que parece representar la molécula del AMPc en la regulación de efectos biológicos en los tripanosomatidios, aún se desconocen los mecanismos relacionados a su señalización celular en estos microorganismos.

1.2.1.1 Las adenilato ciclasas y las fosfodiesterasas en tripanosomatidios

Los niveles intracelulares del AMPc son modulados a través de su síntesis mediante las ACs, y también de su degradación por medio de las PDEs, como se ha descrito previamente. Por medio de los análisis comparativos de las secuencias de los genomas de *T. brucei* (Berriman y col., 2005), *Trypanosoma cruzi* (El-Sayed y col., 2005) y *Leishmania major* (Ivens y col., 2005) con otros genomas ya caracterizados, se ha descrito la existencia de al menos 60, 4 y 9 genes putativos que codifican para las ACs, respectivamente. Además, se ha descrito la existencia de 4 familias de PDEs (designadas como A, B,

C y D), que se encuentran organizados a través de sus cromosomas (Gould y de Koning, 2011). La existencia en los genomas de estos genes putativos son otras evidencias que soportan la importancia del AMPc en la regulación de funciones biológicas en estos parásitos.

1.2.1.1.1 Las adenilato ciclasas

Las ACs de los tripanosomatidios son proteínas de membrana que contienen: 1) un dominio de gran tamaño en el lado amino terminal, el cual es extracelular y presenta una baja homología entre los genes descritos, 2) un dominio transmembrana y 3) un dominio catalítico en el lado carboxilo terminal, el cual es altamente conservado entre los genes descritos (como se muestra en la figura 5).

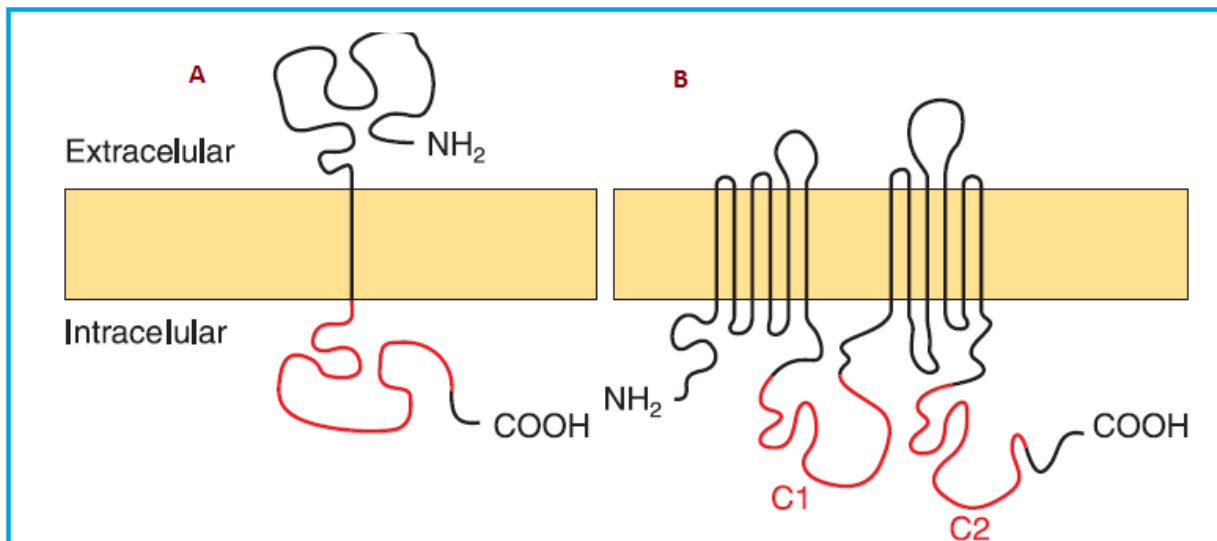


Figura 5: Estructura de las adenilato ciclasas en tripanosomatidios (A) y en mamíferos (B), pudiéndose observar las diferencias entre ellos. Tomado de: Naula y Seebeck, 2000.

Estas ACs difieren de la de los organismos eucarióticos superiores porque estos últimos tienen seis dominios transmembranas y, como se mencionó anteriormente, son activados a través de las proteínas G heterotriméricas que, a su vez, dependen de la activación de los GPCRs. En cambio, en los

tripanosomatidios, no se ha descrito la presencia de genes putativos que codifiquen para las proteínas G heterotriméricas ni para los GPCRs. Adicionalmente, Seebeck y colaboradores (2004), plantean que con una concentración intracelular de 0,1 μM de AMPc que puede ser sintetizada por tan sólo una enzima de AC, se puede desencadenar una señalización en un microorganismo unicelular. Sin embargo y como se mencionó anteriormente, en *T. brucei* se ha descrito la existencia de una cantidad de genes putativos que codifican para las ACs mayor que los existentes en *T. cruzi* y *L. major*, por lo que la expresión de numerosas ACs puede originar entonces una cantidad tóxica de AMPc. También han sido reportadas varias evidencias que soportan a la dimerización de las ACs como uno de los mecanismos requeridos durante su activación (Naula y Seebeck, 2000; Laxman y Beavo, 2007; Gould y de Koning, 2011).

1.2.1.1.2 Las fosfodiesterasas

Muchas de las PDEs presentes en los tripanosomatidios han sido caracterizadas bioquímicamente. Estas PDEs han resultado ser enzimas con una estructura y función estándar, es decir, existen cuatro familias de PDEs las cuales comparten características en común. Las PDEs son proteínas citoplasmáticas con una estructura conservada, en la cual se presentan: 1) una región reguladora en el lado amino terminal, donde están presentes los dominios GAF, que tienen la capacidad de enlazar moléculas de AMPc; 2) en la región carboxilo terminal, está presente el dominio catalítico, el cual es bien conservado entre las PDEs de tripanosomatidios y entre los mamíferos (Gould y de Koning, 2011). Se ha reportado que estas enzimas se expresan de forma diferencial dependiendo de la fase del ciclo de vida del tripanosomatidio. Adicionalmente, las diversas PDEs poseen diferente localización celular (Gould y de Koning, 2011).

Por ejemplo, en *T. brucei*, mediante técnicas de biología molecular, se logró la caracterización de una proteína designada TbPDEB2 (Rascón y col., 2002). A través de la comparación de secuencias en un

programa bioinformático, estos autores demostraron la homología que presentó TbPDE2B con las secuencias de las PDEs clase I de mamíferos, puesto que conserva el dominio catalítico y los dominios GAF. Además, Rascón y colaboradores mostraron, mediante ensayos de interacción, la capacidad de la proteína TbPDE2B recombinante de enlazar moléculas de AMPc en lugar de GMPc. Si bien existen numerosos ligandos que se enlazan a los dominios GAF (Rascón y col., 2002) estos dominios son capaces de enlazar GMPc en las PDEs ya caracterizadas en mamíferos. Por último, mediante ensayos enzimáticos, estos autores demostraron la resistencia de la proteína TbPDE2B a los inhibidores de PDEs en mamíferos como la sildenafil, dypiridamole, etazolato, entre otros (Rascón y col., 2002). Adicionalmente, se ha sugerido que las PDEs de los tripanosomatidios pueden resultar un blanco terapéutico útil para la erradicación de las enfermedades causadas por estos organismos, dado que esta y otras PDEs parecen diferir de las PDEs de mamíferos ya que son resistentes a los inhibidores reportados para ellas.

1.3 Las proteínas quinasas dependientes de AMPc

1.3.1 Las proteínas quinasas dependientes de AMPc en organismos eucarióticos superiores

Las proteínas quinasas (PKs) representan una superfamilia de proteínas con una gran diversidad en sus mecanismos de regulación, estructuras y especificidad de substratos. A su vez, todas estas enzimas comparten una actividad catalítica en común, la fosforilación, la cual ha resultado ser un mecanismo de regulación altamente conservado entre los organismos eucarióticos superiores (Taylor y col., 1988; Hanks y Hunter, 1995).

Las PKs se pueden agrupar en cinco clases, de acuerdo a las similitudes que presentan en la estructura primaria de sus dominios catalíticos: 1) el grupo AGC, que involucra a las proteínas quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos y a la proteína quinasa C; 2) el grupo CAMK, que involucra a las proteínas quinasas que son reguladas por calcio o calmodulina; 3) el grupo CMGC, que incluye a las proteínas quinasas dependientes de ciclinas; 4) las PTKs, proteínas que fosforilan residuos de aminoácidos de tirosina y 5) las OPK, que involucra a otras proteínas quinasas que no pueden ser clasificadas dentro de los grupos antes descritos.

Las proteínas quinasas dependientes de AMPc, pertenecen al grupo AGC de las PKs (Hanks y Hunter, 1995). Estas enzimas efectoras se han mantenido en el curso de la evolución de los eucariotas y han sido caracterizadas bioquímicamente en mamíferos (Taylor y col., 1988; Shalaby y col., 2001; Laxman y Beavo, 2007). Estas enzimas hidrolizan al grupo γ -fosfato del ATP y lo transfieren a los residuos de aminoácidos serina o treonina que se encuentran presentes en una secuencia consenso dentro de un sustrato, y la activación de estas enzimas depende de la presencia de AMPc.

En su forma inactiva, las PKAs son heterotetrámeros compuestos por un dímero de subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C) (figura 6). El enlazamiento de AMPc a las subunidades R ocasiona la liberación de las subunidades C monoméricas (figura 6), las cuales son catalíticamente activas y pueden fosforilar a sus sustratos (Taylor y col., 1988; Hanks y Hunter, 1995). La secuencia consenso de reconocimiento del sustrato es: ***Arg-Arg-cualquier residuo de aminoácido-Ser/Thr-residuo hidrofóbico***, donde el grupo hidroxilo de la cadena lateral del residuo de serina o treonina es el aceptor del grupo fosfato (Hanks y Hunter, 1995). Al reconstituirse la holoenzima, las subunidades R inhiben reversiblemente la actividad de las subunidades C (Taylor y col., 1988). En mamíferos se han descrito tres isoformas de subunidades C, designadas como: C α , C β y C γ ; mientras que se han descrito cuatro isoformas de subunidades R, designadas como: R1 α , R1 β , R11 α , y R11 β .

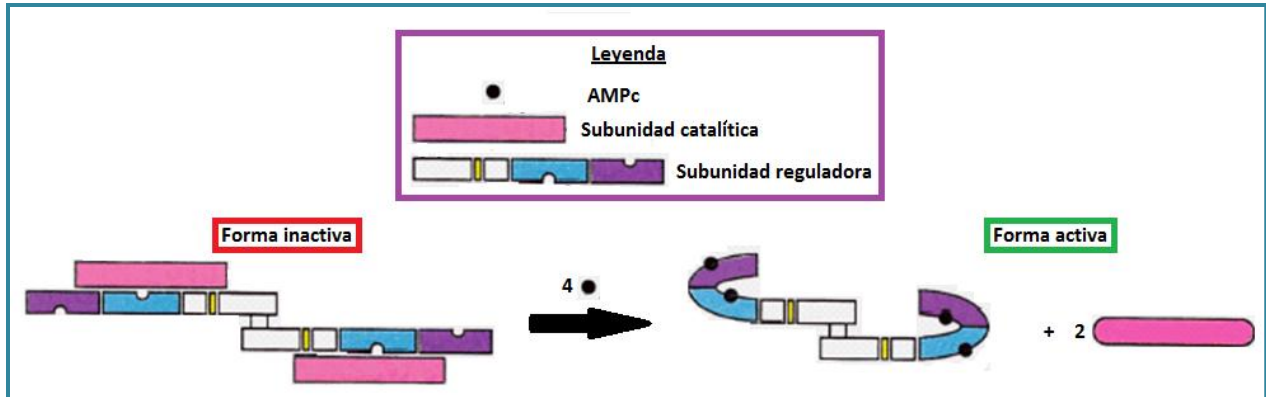


Figura 6: Activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc. Tomado y modificado de: “Clonamiento, purificación y caracterización bioquímica de la “supuesta” subunidad reguladora de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico de *Trypanosoma evansi*”, charla realizada en el IBE por el Dr. José Bubis, el 23 de febrero de 2011.

Como se ilustra en la figura 7, cada subunidad R monomérica está constituida por los siguientes dominios:

1) Dos dominios de enlace de AMPc localizados en la región carboxilo terminal de la proteína, los cuales son muy conservados entre las diferentes isoformas de las subunidades R y se conocen como dominios de enlace de AMPc A y B, respectivamente. Esta región representa aproximadamente 2/3 del total de la proteína. Cada uno de estos dominios contiene un residuo de arginina (Arg) y un residuo de ácido glutámico (Glu), los cuales son requeridos para que el nucleótido cíclico se enlace con alta afinidad. Esto ha sido claramente confirmado con los resultados obtenidos a partir de la estructura cristalina resuelta por difracción de rayos X de la región carboxilo terminal de las subunidades R (Su y col., 1995), la cual ha mostrado que la cadena lateral de la Arg interacciona electrostáticamente con el oxígeno del grupo fosfato del AMPc, mientras que la cadena lateral del Glu interacciona formando un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo libre del anillo de ribosa del AMPc.

2) Una región amino terminal que representa aproximadamente 1/3 del total de la proteína, la cual es muy variable entre las diferentes isoformas de las subunidades R. Esta región contiene el dominio

conocido como D/D (por “dimerization and docking” en inglés), el cual está involucrado tanto en la formación de los dímeros entre las subunidades R, como en la interacción de las subunidades R con las proteínas de anclaje de las PKAs o AKAPs. Adicionalmente, esta región contiene el principal sitio de reconocimiento para la subunidad C (figura 7).

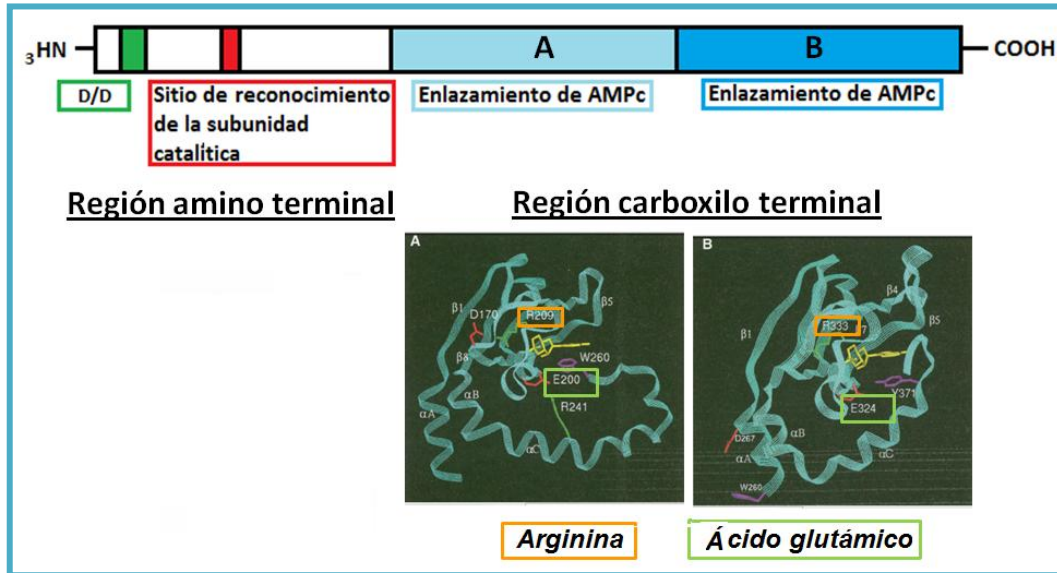


Figura 7: Dominios de interacción presentes en la subunidad reguladora de la PKA de organismos eucarióticos superiores. Tomado y modificado de: “Clonamiento, purificación y caracterización bioquímica de la “supuesta” subunidad reguladora de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico de *Trypanosoma evansi*”, charla realizada en el IBE por el Dr. José Bubis, el 23 de febrero de 2011. En el extremo inferior derecho se muestran la estructura terciaria de los dominios A y B, donde se resaltan los residuos de aminoácidos conservados y requeridos en el enlazamiento de nucleótidos cíclicos. Estos residuos que corresponden a una arginina y un ácido glutámico se muestran enmarcados en un recuadro de color anaranjado y verde, respectivamente. Tomado de: Su y col., 1995.

La caracterización de la estructura de los dominios de la subunidad R en organismos eucarióticos superiores comenzó a ser estudiada a partir de proteólisis específica y limitada con tripsina y termolisina. El fragmento proteolítico estable de mayor tamaño (masa molecular promedio de 33 KDa) corresponde a la región carboxilo terminal de la proteína. Este fragmento retiene los dos dominios de enlazamiento del AMPc, mientras que el fragmento proteolítico de menor tamaño (masa molecular promedio de 11,5 KDa) corresponde al extremo amino terminal y retiene el dominio D/D (Potter y Taylor, 1979^a, 1979^b y 1980).

2. ANTECEDENTES

2.1 Las proteínas quinasas en los tripanosomatidios

Parsons y colaboradores (2005) realizaron el análisis comparativo de los quinomas de los tres tripanosomatidios patogénicos a los cuales se les ha secuenciado completamente su genoma (*T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*). En este reporte se describe que un 2% (aproximadamente 200 genes) de los genomas de estos tripanosomatidios lo constituyen genes que codifican para proteínas quinasas, lo que sugiere la importancia de la fosforilación como mecanismo de regulación en la biología de estos parásitos. Con respecto a la clasificación de las PKs de acuerdo a su similitud en su estructura primaria de los dominios catalíticos, se ha descrito que en los quinomas de estos tripanosomatidios no existen PKs que representen a las PTK, mientras que el grupo de las CMGC están ampliamente representadas en comparación con las AGC, que están pobremente representadas. Las enzimas presentes de estos quinomas no son similares a las presentes en organismos eucarióticos superiores, por lo que se han considerado a las PKs como blancos terapéuticos importantes para la erradicación de enfermedades (Seebeck y col., 2004; Parsons y col., 2005).

De los 200 genes presentes de los quinomas de los tripanosomatidios, se ha identificado que tres de ellos codifican para tres proteínas quinasas relacionadas con las subunidades C de las PKAs de mamíferos, las cuales han sido designadas como PKAC1, PKAC2 Y PKAC3 (Parsons y col., 2005).

Se ha demostrado que las PKAs son esenciales durante la regulación de efectos biológicos en tripanosomatidios. Por ejemplo, los científicos Bao y colaboradores (2008) transfectaron epimastigotes de *T. cruzi* con el vector de expresión pTREX-PKI-HA, el cual contiene el gen que codifica para el péptido PKI que es un inhibidor específico de las PKAs ($K_i = 2,5 \text{ nM}$) y se enlaza fuertemente a la subunidad C de

la PKA. La expresión de este péptido ejerció un efecto letal en la viabilidad de los epimastigotes de *T. cruzi*. El mismo efecto aconteció cuando adicionaron dosis de 10 μM de otro inhibidor específico de las PKAs, el H89, a un cultivo de epimastigotes (Bao y col., 2008).

En *T. brucei* se ha identificado y caracterizado parcialmente una proteína que fue designada como la subunidad R de una PKA putativa (Shalaby y col. 2001). Un análisis comparativo de secuencia demostró que esta proteína era homóloga a la subunidad R tipo I de la PKA de mamíferos. Además, Shalaby y colaboradores (2001) mostraron mediante experimentos de inmunoprecipitación que esta proteína putativa se encontraba asociada a una enzima tipo quinasa, que poseía la capacidad de fosforilar un sustrato específico de la PKA de mamíferos. Dado que la proteína co-inmunoprecipitada fue reconocida por un anticuerpo dirigido en contra de la subunidad C de la PKA de bovino, estos investigadores concluyeron que esta proteína correspondía a la subunidad C de la PKA de este tripanosomatidio (Shalaby y col. 2001). Sin embargo, la PKA de *T. brucei* parece no estar regulada bajo los mecanismos ya conocidos para las PKAs de eucariotas superiores, puesto que la adición de AMPc al inmunoprecipitado no estimuló la actividad quinasa, al contrario, ocasionó un efecto inhibitorio. En cambio, la adición de GMPc si ocasionó dicha estimulación, por lo que Shalaby y colaboradores formularon como hipótesis que la actividad de esta PKA putativa era estimulada por GMPc (Shalaby y col. 2001). Contradictoriamente, diversos estudios enfatizan que aun no se ha identificado al GMPc, ni a una actividad guanilato ciclasa que sintetice GMPc o una actividad PDE específica para GMPc en los tripanosomatidios (Laxman y Beavo, 2007). Adicionalmente, la cantidad de GMPc requerida para la activación de esta quinasa fue 200 veces mayor que la requerida para estimular la actividad quinasa de las PKAs reportadas en otros organismos (Shalaby y col., 2001). Estas concentraciones de nucleótidos cíclicos son muy superiores a las esperadas bajo condiciones fisiológicas.

2.1.1 Una proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de las PKAs de eucariotas superiores

En *T. evansi* se identificó una proteína que presenta homología con la subunidad R de las PKAs de mamíferos. Estos hallazgos fueron realizados por un grupo de científicos compuesto por: el Dr. José Bubis, investigador de la Universidad Simón Bolívar, en conjunto con el Dr. Juan Carlos Martínez, investigador del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) y la Dra. Susan Taylor, investigadora de la Universidad de California en San Diego, Estados Unidos, entre otros.

Estos científicos determinaron por medio de secuenciación, que este gen era 100% idéntico en secuencia al gen presente en *T. brucei* (Bubis y col., comunicación personal). La proteína codificada por este gen contiene 499 residuos de aminoácidos y una masa molecular estimada de 56,725 kDa. Por otra parte, esta proteína es un monómero incapaz de enlazar nucleótidos cíclicos. Con respecto a sus dominios, estos investigadores describieron que en la región carboxilo terminal están presentes dos posibles dominios de enlazamiento de nucleótidos cíclicos (figura 8). En estos dominios existen reemplazos en los residuos de aminoácidos que son imprescindibles para el enlazamiento de los nucleótidos cíclicos. Los cuadros grises de la figura 8 enmarcan los residuos de aminoácidos que reemplazaron a los residuos esenciales para el enlazamiento de nucleótidos cíclicos. En particular: i) los residuos de arginina mencionados previamente en la sección 1.3.1, están reemplazados por una treonina en uno de los dominios y por una asparagina en el otro; ii) ciertos residuos de alanina, los cuales también interaccionan con el grupo fosfato del AMPc, están reemplazados por valina, y iii) los residuos de ácido glutámico mencionados previamente en la sección 1.3.1, están reemplazados por residuos de alanina. Estos reemplazos pudieran explicar la carencia de enlazamiento de nucleótidos cíclicos observada para esta proteína.

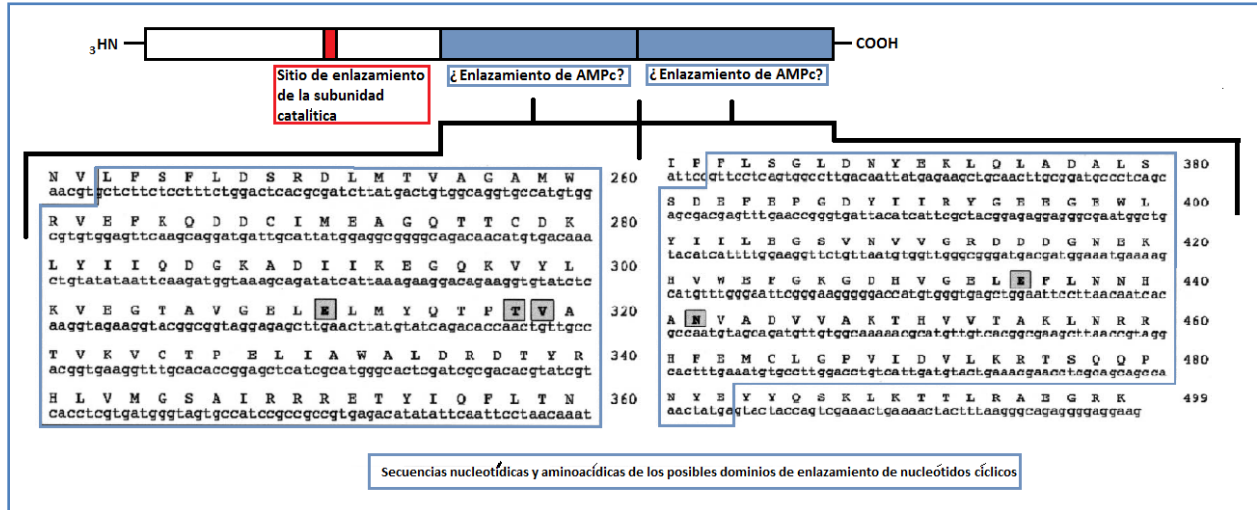


Figura 8: (Arriba) Dominios de interacción presentes en una proteína de *Trypanosoma evansi* que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos. **(Abajo)** Secuencias nucleotídicas y de residuos de aminoácidos en los posibles dominios de enlazamiento de nucleótidos cíclicos. Los recuadros grises enmarcados engloban los residuos de aminoácidos sustituidos. Tomado y modificado de: "Clonamiento, purificación y caracterización bioquímica de la "supuesta" subunidad reguladora de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico de *Trypanosoma evansi*", charla realizada en el IBE por el Dr. José Bubis, el 23 de febrero de 2011.

La región amino terminal tiene mayor longitud que la correspondiente en la proteína homóloga de mamíferos (figura 9). Esta región contiene el sitio de reconocimiento para la subunidad C, cuya secuencia es: **Arginina-Arginina-Treonina-Treonina-Valina**. Esta región no contiene el dominio D/D, lo que fortaleció la conclusión alcanzada por estos investigadores durante la determinación del tamaño de la proteína por cromatografía de exclusión molecular, en donde demostraron que la subunidad R es un monómero.

Estudios preliminares de la hidrólisis de la proteína de interés sugirieron que esta proteína contiene una región bisagra muy susceptible a cortes por enzimas proteolíticas (Bubis y col., comunicación personal). En este proyecto, se estudió la posibilidad de obtener un corte proteolítico específico a proteasa de esta proteína, en caso de tenerlo sería posible la detección y la separación de estos dos polipéptidos, pudiéndose determinar los dominios presentes en dicha proteína, tal como se

describió previamente con la caracterización de la subunidad R de la PKA del músculo esquelético porcino (Potter y Taylor, 1979^a, 1979^b y 1980).

Por último, mediante estudios bioinformáticos, estos científicos obtuvieron un modelo tridimensional de la estructura de la región amino terminal de la proteína, mostrándose que esta región contiene repeticiones ricas en leucinas. Estos resultados sugieren que la región amino terminal de la proteína pudiera estar involucrada en interacciones con otras proteínas, puesto que este tipo de motivos es característico de los sitios de interacción proteína-proteína. En base a las evidencias mostradas, se propone que la función de la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad R de las PKAs de mamíferos, pudiera tener que ver con el anclaje de las subunidades C putativas de *T. evansi* a los sustratos que requieren ser fosforilados, generando un mecanismo eficiente en la diseminación de la información celular.

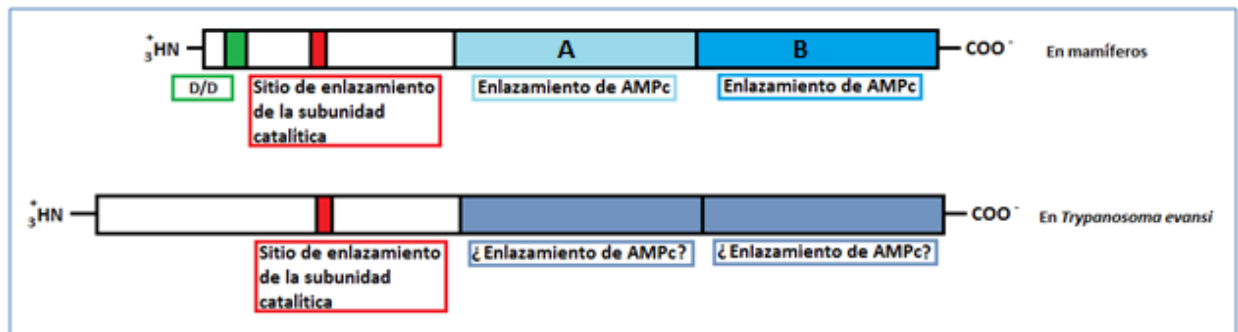


Figura 9: Esquema comparativo del tamaño y de los dominios presentes en la subunidad R de mamíferos con la proteína en *Trypanosoma evansi* que presenta homología con dicha subunidad R en mamíferos. Tomado y modificado de: "Clonamiento, purificación y caracterización bioquímica de la "supuesta" subunidad reguladora de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico de *Trypanosoma evansi*", charla realizada en el IBE por el Dr. José Bubis, el 23 de febrero de 2011.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Emplear ensayos de interacción proteína-proteína para la detección de interacciones entre una proteína de *Trypanosoma evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA y otras proteínas presentes en el parásito.

3.2. Objetivos específicos

- Expresar en bacterias a la proteína de *Trypanosoma evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos.
- Purificar la proteína recombinante mediante métodos cromatográficos.
- Purificar parásitos de *Trypanosoma evansi* con la finalidad de obtener extractos totales y separar las fracciones solubles y particuladas del parásito.
- Identificar las proteínas del parásito que interaccionan con la proteína de *Trypanosoma evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Expresión en *Escherichia coli* M15_[pREP4] de la proteína recombinante de *Trypanosoma evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos

Se tenía a la disposición la cepa bacteriana *E. coli* M15_[pREP4] (The QIA expressionist) recombinante, la cual integra al vector de expresión pQE triSystem (The QIA expressionist) con el gen correspondiente a la proteína objeto de estudio, así como integra al vector de expresión pREP4, que regula la expresión génica. Para el proceso de clonación del gen que codifica a la proteína *T. evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos, Bubis y colaboradores se sustentaron en la base de datos del genoma de *T. brucei*, a partir del cual fabricaron los oligonucleótidos apropiados para amplificar por PCR al gen correspondiente a partir del ADN genómico de *T. evansi*. A partir del amplicón obtenido, se modificó su codón de terminación, el cual fue sustituido por el codón de triptófano y se adicionó ocho residuos de histidina para crear una proteína de fusión que facilitara la purificación y el seguimiento con anticuerpos anti-polihistidinas.

Esta cepa bacteriana se encontraba en estado latente, almacenada en glicerol, y para su activación fueron sembradas en placas de Petri con medio Luria-Bertani o Medio LB (8 g/L de Triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl), Ampicilina (Concentración final = 100 µg/mL, de Sigma-Aldrich) y Kanamicina (Cf = 25 µg/mL, de Sigma-Aldrich) a través de un sembrado por agotamiento e incubación a 37 °C (incubadora: modelo L15, de SHEL LAB) durante 18 horas.

Luego, se escogió una de las colonias activadas de *E. coli* M15 de la placa de Petri y se incubó en un medio Triptona con Extracto de Levadura, conocido como medio YT (8 g/L de Triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl) líquido con Ampicilina (100 µg/mL) y Kanamicina (25 µg/mL),

dejándose en agitación (250 rpm) a 37 °C (incubadora: MaxQ4000, Thermo Scientific) durante 18 horas. Se distinguió el crecimiento bacteriano por la turbidez presentada en este medio líquido.

Se diluyó 1/50 el cultivo bacteriano que estuvo en crecimiento previamente en un nuevo medio de cultivo, formado por medio YT con Ampicilina (100 µg/mL) y Kanamicina (25 µg/mL), con la finalidad de promover el crecimiento exponencial de las bacterias a las cuales se le inducirá la expresión de la proteína recombinante de interés. Se evaluó el crecimiento bacteriano en este medio de cultivo a través de lecturas de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (espectrofotómetro: SmartSpec™ 3000, de BIO-RAD). Cuando se alcanzó una densidad óptica de aproximadamente 0,6 se indujo la expresión de la proteína recombinante de interés con: 0,5 mM ó 1 mM de Isopropil-β-D-1 Tiogalactopiranosido o IPTG (de Sigma-Aldrich), seguido de una incubación a una temperatura de 16 °C ó 37 °C, con agitación a 250 rpm durante 18 horas.

Una vez culminado el periodo de incubación de la inducción de la expresión, el cultivo bacteriano fue separado del medio mediante centrifugación a 9000 g a 4 °C durante 30 minutos (Centrífuga: Sorvall Evolution RC Super Speed, rotores: F8-6x1000y, F10-6x500y. Thermo Scientific). El sobrenadante fue descartado, mientras que el sedimento en donde estaba presente el cultivo bacteriano, se lisó con el fin de obtener el contenido citoplasmático de dicho cultivo. En esta fracción designada también como sobrenadante, están presentes las proteínas solubles bacterianas, incluyendo la fracción que se mantuvo soluble de la proteína recombinante de interés.

Para el lisado celular, se evaluaron tres procedimientos: 1) la suspensión del cultivo bacteriano en tres soluciones de distinta composición: solución de enlazamiento en condiciones nativas o NBB (50,7 mM de NaH₂PO₄; 500 mM de NaCl, pH 8) con 10 mM de Imidazol (de Sigma-Aldrich), solución A de lisis (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 10 mM de Imidazol, pH 8) y solución B de lisis (20 mM de Tris HCl, 25 mM de EDTA, 5 mM de Imidazol, pH 8). La diferencia resaltante de estas tres soluciones es la

cantidad de cloruro de sodio que presentan, siendo de 500 mM, 300 mM y 0 mM respectivamente, la presencia de sales genera una diferencia osmótica entre el interior y exterior celular bacteriano, lo que ocasiona la ruptura de la membrana. 2) La adición de lisozima (Cf = 1mg/mL, de Sigma-Aldrich), enzima que degrada la pared celular bacteriana, siendo su sustrato natural el peptidoglicano, la cual se dejó en agitación a 4 °C durante una hora. 3) Tres procesos de congelación en Nitrógeno líquido y descongelación a 37 °C del cultivo bacteriano, estos cambios bruscos de temperatura ocasionan la ruptura de membranas.

Seguido de la suspensión, se empleó la sonicación (sonicador: ultrasonic procesor, Cole Parmer), aplicando seis pulsos con 20 segundos de duración con amplitud máxima e intervalos de 30 segundos de descanso, en frío, para asegurar el rompimiento efectivo de las membranas celulares. Luego, se separó la fracción soluble o sobrenadante del resto del contenido del lisado celular mediante una centrifugación a 9500 g a 4 °C durante 30 minutos.

4.2 Purificación de la proteína recombinante de *Trypanosoma evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos

La purificación consistió en la separación de la proteína recombinante de interés del resto de los componentes celulares presentes en la fracción soluble procedente del lisado celular. Se empleó una cromatografía de afinidad a través de la resina HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific) que contiene iones de níquel. Se incubaron 10 mL de la resina con el sobrenadante y se dejó en agitación a 4 °C durante 18 horas. Para la elución de los componentes que se enlazaron inespecíficamente a la resina, se realizaron lavados a la columna con NBB a 10 mM y 100 mM de Imidazol, y para la recolección de las fracciones enriquecidas con la proteína recombinante, se realizó un gradiente de elución con concentración

creciente de Imidazol de 100 mM hasta 500 mM (sistema de purificación: BioLogic LP, de BIO-RAD. Recolector de muestras: Isco Foxy, de Lincoln-Nebraska). La elución de las proteínas fue monitoreada midiendo la absorbancia de las fracciones recolectadas a una λ de 232 nm y 280 nm.

Por último, las fracciones recolectadas que estaban enriquecidas con la proteína recombinante, fueron ultrafiltradas con el fin de concentrarla y dializarla al mismo tiempo. Utilizando un ultrafiltrador que contenía una membrana de 10.000 NMWL (límite de masa molecular nominal) de rango de retención y que estaba conectado a una bomba de nitrógeno, se consiguió disminuir el volumen en el que se encontraba soluble la proteína recombinante hasta en una décima parte, así como se pudo reemplazar la solución en el que estaba presente, por una solución que se designó como solución de diálisis (50 mM de Tris, 100 mM de NaCl, 2 mM de EDTA y 2 mM de EGTA, pH 7,5). La cantidad de proteína fue cuantificada mediante la técnica colorimétrica de Bradford.

En una ocasión, seguido de la cromatografía de afinidad, se realizó una cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones recolectadas obtenidas de la purificación previamente descrita, fueron recolectadas y dializadas con una membrana cuyo tamaño del poro fue de 3500 Da, en contra de 1 L de solución de NBB sin cloruro de sodio, o en contra de polietilenglicol, sustancia de elevada porosidad la cual deshidrata la muestra a ser dializada. Seguidamente, la fracción concentrada por diálisis se incubó con una resina de Qsefarsa (GE Healthcare), la cual es de intercambio aniónico fuerte, y se dejó en agitación durante 18 horas a fin de promover la adsorción de la proteína recombinante. Finalmente, la elución de la proteína se realizó empleando un gradiente de concentración creciente de cloruro de sodio, de 0 mM a 500 mM en una solución de fosfato de potasio (20 mM de KH_2PO_4 , pH 7,5).

4.3 Digestión parcial de la proteína recombinante de interés mediante proteasas

Con la digestión parcial de la proteína recombinante, se pretendió analizar si la proteína contenía regiones con mayor susceptibilidad a ser cortada por ciertas enzimas proteolíticas. De ser así, se debería generar un número discreto de polipéptidos. Para ello se emplearon las siguientes proteasas:

- ***α -Quimotripsina de páncreas bovino:*** serina-proteasa que hidroliza principalmente los enlaces peptídicos en el lado carboxilo terminal de los residuos de Tirosina, Fenilalanina y Triptófano. De forma secundaria hidroliza a Leucina, Metionina, Isoleucina, Serina, Treonina, Valina, Histidina, Glicina y Alanina. La actividad óptima se alcanza a 37 °C a pH 7,8. La enzima contiene al inhibidor TLCK (por N α -p-Tosyl-L-lysine Chloromethyl Ketone en inglés), el cual es un inhibidor irreversible de la tripsina. La quimotripsina es tratada con TLCK para inactivar a la tripsina que pueda estar presente en la preparación comercial, ya que la tripsina es la que hidroliza al precursor (el quimotripsinógeno) de la quimotripsina. La enzima fue obtenida de Sigma-Aldrich.
- ***Termolisina del Bacillus thermoproteolyticus rokko:*** enzima termofílica, metaloendopeptidasa cuyo cofactor son los iones de calcio y de zinc. Esta enzima hidroliza el lado amino terminal de los siguientes residuos aminoacídicos: Leucina, Fenilalanina, Isoleucina, Valina, Metionina y Alanina. La actividad óptima se alcanza a una temperatura de 70 °C y a pH de 8. La enzima fue obtenida de Sigma-Aldrich.
- ***Tripsina de páncreas bovino:*** serina proteasa que hidroliza enlaces peptídicos del lado carboxilo terminal de los residuos de Lisina y Arginina, esta capacidad de hidrólisis decrece en presencia de un residuo ácido en el sitio de corte y no ocurre si en el lado carboxilo terminal del sitio de corte se encuentra un residuo de prolina. Se logra una actividad óptima a un pH de 7 a 9. La enzima contiene al inhibidor TPCK (por N α -p-Tosyl-L-phenylalanine Chloromethyl Ketone en

inglés), el cual es un inhibidor irreversible de la quimotripsina y de ciertas cisteínas proteasas como las caspasas y la papaína, entre otras. El TPCK está presente para inactivar la actividad contaminante de la quimotripsina que pudiera estar presente en la preparación comercial, sin afectar la actividad de la tripsina. La enzima fue obtenida de Sigma-Aldrich.

La proteína recombinante de interés (60 μg) fue incubada con distintas cantidades de: 1) quimotripsina (1×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$; 7×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2) tripsina ($0,6 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 6×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3) termolisina (6×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$; 10×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 29×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las relaciones *proteasa* : *proteína* utilizadas se reportan en la siguiente tabla. Estos ensayos proteolíticos tuvieron una duración de 30 minutos, con una incubación a 4 °C para los ensayos realizados con quimotripsina y tripsina, y a temperatura ambiente para los que se emplearon con termolisina.

Tabla 1: Relación en cantidad de proteasa:proteína empleadas durante la digestión parcial de la proteína recombinante de interés.

	Proteasa	Proteína		Proteasa	Proteína		Proteasa	Proteína
Quimotripsina	1	500	Tripsina	1	1000	Termolisina	1	100
		200			500			50
		100			200			20
		50			100			10
		0			0			0

4.4 Purificación de *Trypanosoma evansi*

Cuatro ratas albinas adultas (Sprague-Dawley), de aproximadamente 300 g, fueron inoculadas mediante una inyección por vía peritoneal de una muestra criopreservada de *T. evansi* (aislado TEVA1) que contenía alrededor de 100 parásitos por campo. Durante los siguientes cuatro días posteriores a la inoculación, se evaluó la aparición de los síntomas típicos (ojos brillantes y pelaje levantado) y se estimó la parasitemia a partir del análisis por microscopio óptico de la sangre de las ratas, la cual fue extraída de su cola. Al alcanzar un número entre 60-100 parásitos por campo, se extrajo la sangre de estas ratas mediante punción cardíaca, utilizando EDTA (500 mM) como anticoagulante. Durante la purificación de los parásitos se utilizó una solución de fosfato salino con Glucosa o PBSG (85 mM NaCl, 7,6 mM de NaH_2PO_4 , 116 mM de Na_2HPO_4 , 1% de glucosa), la cual permite disminuir el estrés metabólico que puedan presentar los parásitos.

La sangre recolectada fue centrifugada a 3000 g a 4 °C durante 15 minutos (centrífuga: 5810R, rotor empleado A-4-62, de eppendorf). De esta centrifugación se obtiene la separación en tres capas de los componentes sanguíneos de las ratas infectadas: una capa superior que contiene el plasma sanguíneo, una capa intermedia blanca en la que están presentes los parásitos y los glóbulos blancos, y por último, una capa inferior roja en la que están presentes los glóbulos rojos. Se recolectó cuidadosamente la capa blanca, y se aplicó sobre una columna de DEAE celulosa (Lahman y Godfrey, 1970), previamente equilibrada con una solución de fosfato salino o PBS (142 mM de NaCl, 12,8 mM de NaH_2PO_4 , 193 mM de Na_2HPO_4). La columna fue eluída empleando PBSG y cuando las fracciones comenzaron a tornarse ligeramente turbias, se procedió a la recolección de las fracciones contentivas de los parásitos. Se midió el volumen total, y se cuantificó el número de parásitos recolectados. Los parásitos obtenidos fueron cuantificados en una cámara de Newbauber (usando una dilución 1/100 de la muestra recolectada en PBS) de la siguiente manera:

Número total de parásitos [parásitos/mL] = Número de parásitos contados en la cámara de Newbauber $\times 10^4 \times$ Factor de dilución (100) \times volumen recolectado durante la purificación (en mL)

Por último, el eluato recolectado se centrifugó a 3000 g a 4 °C por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se guardó a -80 °C.

4.5 Ensayo de interacción proteína - proteína

El objetivo central de este proyecto de investigación consistió en la determinación de las posibles interacciones proteína-proteína que pudieran existir entre la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos y otras proteínas presentes en el parásito. Para ello, se emplearon técnicas de cromatografía de afinidad, debido a que la proteína recombinante en estudio tiene fusionada en su extremo carboxilo terminal ocho residuos de histidina.

Primero, en dos tubos de microcentrífuga Eppendorf se incubaron 50 μ g de la proteína recombinante con 100 μ L de resina Ni-NTA, en otros dos se incubaron solamente con 100 μ L de resina Ni-NTA; la resina fue equilibrada con NBB con 10 mM de Imidazol. Se dejó en agitación a 4 °C durante 18 horas.

A fin de obtener las fracciones solubles y particuladas, los parásitos obtenidos de la sangre de las ratas infectadas fueron lisados por medio de su suspensión en 3 mL de solución de lisis (5 mM de Tris base, 2 mM de EDTA, 1/100 coctail de inhibidores de proteasas, pH 7,2), seguido de su sonicación en frío, aplicando seis pulsos de 10 segundos de duración con amplitud de 0,4 Watts e intervalos de 60 segundos de descanso. Luego, se separó el sobrenadante del resto del contenido del lisado celular mediante una ultracentrifugación a 100.000 g a 4 °C durante 30 minutos (Ultracentrífuga: (Optima L100 XP Preparative Ultracentrifuge. Rotor: 70ti. Beckman-coulter). El volumen obtenido de este

sobrenadante, se guardó a 4 °C hasta su uso posterior. El sedimento obtenido de la centrifugación fue resuspendido en 3 mL de buffer de lisis, y fue sonicado y centrifugado bajo las mismas condiciones descritas previamente. El sobrenadante obtenido de esta segunda ultracentrifugación fue unido con el primer sobrenadante obtenido, para constituir lo que se designó como fracción soluble. Para determinar las interacciones que ocurren entre la proteína recombinante en estudio y las proteínas presentes en la fracción soluble de *T. evansi*, se incubó esta con una de las resinas que tienen enlazadas a la proteína recombinante. Para determinar los enlazamientos inespecíficos que pudieran ocurrir entre las proteínas presentes en la fracción soluble con la resina, se incubó a la resina que no tiene enlazado a la proteína recombinante con la fracción soluble de *T. evansi*.

El sedimento obtenido de la ultracentrifugación, el cual contenía la fracción particulada del parásito, fue nuevamente homogenizado bajo las mismas condiciones ya descritas, con la diferencia de que a la solución de lisis se le adicionó el detergente Tritón X-100 al 1%. Luego, se separó la fracción solubilizada por el detergente del residuo insoluble mediante una ultracentrifugación a 100.000 g a 4 °C durante 30 minutos. Para determinar las interacciones que ocurren entre la proteína recombinante en estudio y las proteínas presentes en la fracción particulada de *T. evansi*, se incubó esta fracción con una de las resinas que tienen enlazadas a la proteína recombinante. Para determinar los enlazamientos inespecíficos que pueden ocurrir entre las proteínas presentes en la fracción particulada con la resina, se incubó a la resina que no tiene enlazado a la proteína recombinante con la fracción particulada de *T. evansi*.

Estas cuatro resinas se dejaron en agitación a 4 °C durante 18 horas. Culminado este tiempo, se le realizaron a las resinas tres lavados, cada uno con 1 mL con NBB y cuatro lavados, cada uno con 1 mL de NBB en presencia de 10 mM Imidazol, cada lavado se dejó en agitación a 4 °C durante 45 minutos y luego se descartó mediante su separación por centrifugación (Centrífuga 5415, eppendorf). Por último, a

las resinas se les adicionó solución de muestra para electroforesis (0,16 M de Tris base, 3% de SDS, 31,3 % de 2-mercaptoetanol, 31,3% de glicerol, 0,13 mg/mL de Azul de bromofenol).

4.6 Técnicas empleadas para el análisis de las experiencias realizadas

4.6.1 Corridas electroforéticas en geles de SDS-poliacrilamida

Las corridas electroforéticas en geles de SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) consisten en la migración de las proteínas a través de un gel de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su masa molecular y, una vez teñidos, se facilita la visualización de las proteínas a manera de bandas, las cuales serán posteriormente analizadas e interpretadas.

Los geles de solución realizados fueron al 8% o al 12% de poliacrilamida, mientras que el gel de estancamiento se preparó al 6% de poliacrilamida. Luego de la polimerización del gel de estancamiento, se preparó la cámara de corrida (de BIO-RAD), en la que se incorporó dentro de la cámara los geles en posición vertical, junto con la adición de la solución de carga de SDS-PAGE (25 mM de Tris HCl, 35 mM de SDS, 2 M de glicina).

Una vez preparadas las muestras (su desnaturización ocurrió mediante SDS, β -mercaptoetanol y el calentamiento de las muestra), se sembraron en los pozos del gel. Para la corrida electroforética, se aplicó una diferencia de potencial eléctrico de 80V hasta que las muestras alcanzaron el límite superior del gel de resolución, luego se incrementó la diferencia de potencial a 100V durante la corrida y separación de las proteínas de la muestra en el gel de resolución. Luego de la corrida electroforética se procedió a la tinción del gel en solución colorante de Azul de Coomassie (0,3 % de Azul de R-250, 25% de

propanol, 10 % de ácido acético), dejándose en agitación durante al menos dos horas, seguido de su decoloración con la solución decolorante. En algunos casos, los geles fueron teñidos mediante el reactivo SYPRO- Orange (Molecular probes). Por último, los geles teñidos fueron secados (secador de geles: Hoefer SLab GD-2000 de Amersham biosciences).

4.6.2 Western blot

Con la técnica de Western blot (Towbin, 1979) fue posible identificar a la proteína recombinante de interés en las muestras de estudio, dicho reconocimiento ocurrió mediante la inmunodetección con el uso de anticuerpos.

En una cámara de transferencia (semiseca, de BIO-RAD), se transfirieron las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Tanto la membrana de nitrocelulosa, como el gel y los filtros empleados durante esta transferencia fueron incubados previamente con la solución de transferencia (14,415 g/L de Glicina, 3,04 g/L de Tris base, 20 % (v/v) de Metanol). La transferencia ocurrió con la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico de 25V durante 1 hora y 10 minutos. Se verificó la transferencia mediante la tinción reversible con solución de Ponceau's (0,1% de rojo de Ponceau's, 5% de ácido acético).

Para el inmuno-ensayo, se procedió a bloquear la membrana con una solución de bloqueo (TBS-Tween al 0,05%, 5% de leche descremada) durante 18 horas en agitación a 4 °C. Seguidamente se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno con una solución de Tris Salino o TBS (20 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,6) con el detergente Tween al 0,05% (Promega). Se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, dejándose en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos primarios empleados, es decir, los que son específicos a las proteína a

identificar, fueron: anticuerpo monoclonal anti-polihistidina (de SIGMA, dilución empleada: 1/6.000), anticuerpo policlonal anti-reguladora de *T. evansi* recombinante, proveniente de fluido ascítico de ratón (USB, dilución empleada: 1/5.000).

Luego de este tiempo, se realizaron otros tres lavados por 5 minutos con TBS-T y se procedió a la segunda incubación con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo, dejándose en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. El anticuerpo secundario empleado, el que detecta el anticuerpo primario y que tiene fusionado una enzima informadora, fue: antiIgG de ratón conjugado a peroxidasa (de Thermo Scientific). La dilución empleada cuando se usó con el anticuerpo primario anti-polihistidina fue de 1/10.000; la dilución empleada cuando se usó con el anticuerpo primario anti-reguladora recombinante fue de 1/7.500.

Culminado este tiempo, se realizaron otros tres lavados a la membrana con TBS-T y se procedió al ensayo enzimático quimioluminiscente. En un cuarto oscuro, se incorporó a la membrana el sustrato específico de la peroxidasa (SuperSignal® West Pico, de Thermo Scientific) durante cinco minutos y luego se expuso la membrana a una película autoradiográfica que se sensibiliza por la luminiscencia, de 1 a 15 minutos. Seguidamente, esta película autoradiográfica se incubó durante 30 segundos en solución reveladora, se lavó con agua y seguidamente por solución fijadora durante 1 minuto.

4.6.3 Cuantificación de proteína mediante la técnica colorimétrica de Bradford

Para la determinación de la cantidad de proteínas (Bradford, 1976), se empleó un ensayo de cuantificación colorimétrica de proteínas, mediante el kit Quick Start™ Bradford (BIO-RAD). Se realizó el ensayo en placas de ELISA, en donde se sembraron por duplicado 150,00 µL de los puntos de la curva de calibración, las cuales están compuestas por la proteína gamma globulina de bovino: 0,00 µg/mL (blanco

de la muestra); 0,50 µg/mL; 1,00 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,00 µg/mL; 10,00 µg/mL; 20 µg/mL y 40 µg/mL. Luego, se sembraron por triplicado 150 µL de la muestra problema en diluciones: 1/5; 1/10 y 1/50. Seguidamente, a estas muestras se le agregó 150,00 µL del reactivo de Bradford, se dejó en agitación durante cinco minutos a temperatura ambiente y se leyeron las muestras en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 595 nm. Cuando se obtenía valores de regresión lineal (R^2) entre 0,8 a 1,00, se emplearon la pendiente y el punto de corte en el eje Y de la ecuación de la recta ($Y = a.X+b$) reportada de la curva de calibración. Las absorbancias obtenidas de las muestras problemas, se introdujeron en la ecuación de la recta y así se calculó la concentración de las proteínas en las muestras de estudio.

5. RESULTADOS

5.1 Expresión en *Escherichia coli* M15_[pREP4] de la proteína recombinante de *Trypanosoma evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos

La expresión de la proteína en los cultivos bacterianos fue evaluada a dos temperaturas, 37 °C (figura 10) y 16 °C (figura 11), y se analizó si la proteína expresada permanecía en la fracción soluble o en la fracción particulada del lisado celular bacteriano. La proteína expresada en los cultivos bacterianos mantenidos a 37 °C resultó ser insoluble y se encontró en su totalidad en la fracción particulada bacteriana (Figura 10). Por el contrario, la proteína recombinante obtenida a partir de los cultivos bacterianos mantenidos a 16 °C fue soluble. En consecuencia, se escogió la temperatura de 16 °C como la temperatura óptima para la expresión de la proteína de interés.

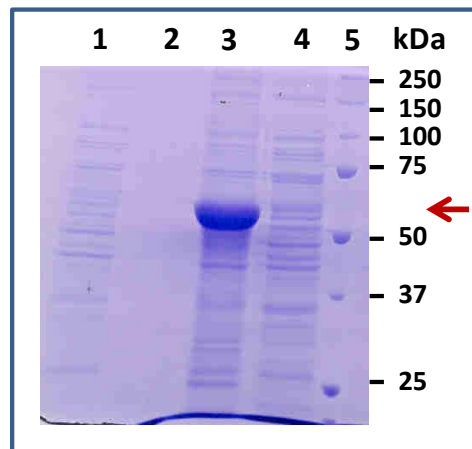


Figura 10: Expresión de la proteína recombinante de interés a 37 °C.

La figura muestra un gel de SDS-PAGE al 12%, teñido con Azul de Coomassie, donde se corrieron las siguientes muestras:

1: sedimento del producto del homogeneizado bacteriano obtenido luego de 4 horas de incubación, de un cultivo bacteriano al que no se le adicionó IPTG. **2:** sobrenadante del producto del homogeneizado bacteriano obtenido luego de 4 horas de incubación, de un cultivo bacteriano al que no se le adicionó IPTG. **3:** sedimento del producto del homogeneizado bacteriano obtenido luego de 4 horas de incubación, de un cultivo bacteriano al que se le adicionó 1 mM de IPTG. **4:** sobrenadante del producto del homogeneizado bacteriano obtenido luego de 4 horas de incubación, de un cultivo bacteriano al que se le adicionó 1 mM de IPTG. **5:** Patrón de masas moleculares (Invitrogen). La flecha roja señala la banda polipeptídica con una masa molecular aparente de 57 kDa, la cual se expresa durante la inducción con IPTG.

Adicionalmente, se evaluó la condición óptima de tiempo de inducción de la expresión de la proteína recombinante con 0,5 mM de IPTG, y para ello se tomaron muestras del cultivo bacteriano en distintas fases del experimento. Como control, se realizó un experimento similar en ausencia de IPTG. En la figura 11 se muestra un gel de electroforesis ilustrando el perfil proteico a través del tiempo, de las correspondientes fracciones particulada y soluble provenientes del lisado total bacteriano, en ausencia (panel A) y presencia (panel B) de IPTG. Inicialmente, se tomaron muestras al momento cuando el crecimiento bacteriano alcanzó una densidad óptica de 0,6, justo antes de inducir la expresión de la proteína con IPTG (carriles 2 y 8, paneles A y B, figura 11). Luego, se tomaron muestras cada 30 minutos durante 2 horas (carriles 3-6 y 9-12, paneles A y B, figura 11), y finalmente, cuando culminaron las 12 horas de incubación a 16 °C (carriles 7 y 13, figura 11).

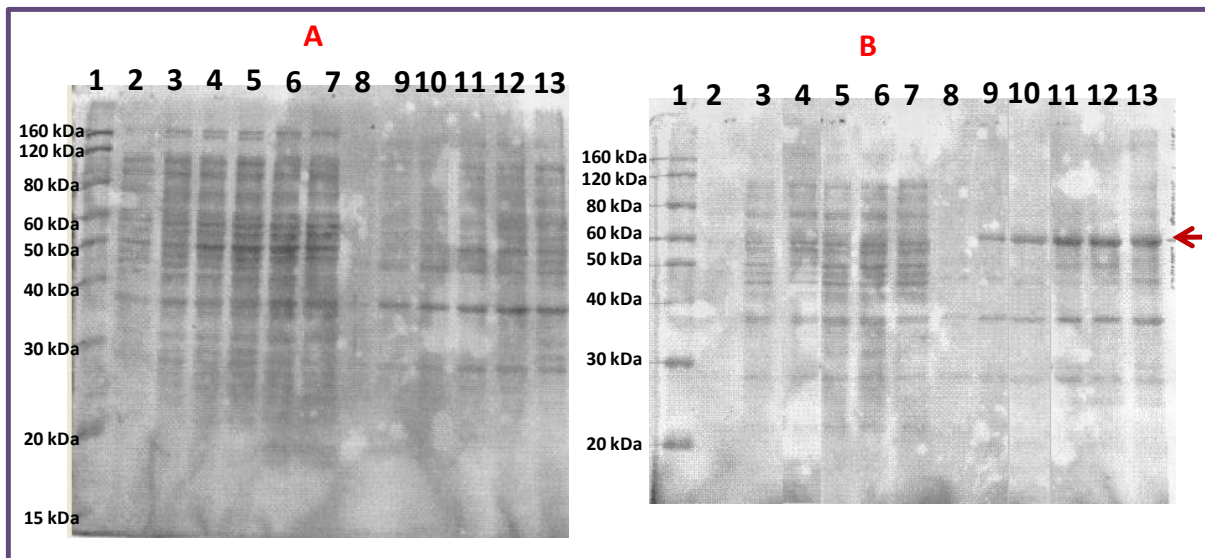


Figura 11: Análisis de la cinética de la expresión a 16 °C de la proteína recombinante de interés.

La figura muestra geles de SDS-PAGE al 12%, teñidos con SYPRO-Orange, donde se corrieron muestras recolectadas en un cultivo bacteriano al que no se le adicionó IPTG (**A**); o muestras recolectadas en un cultivo bacteriano al que se le adicionó IPTG (**B**). **1:** Patrón de masas moleculares (Invitrogen); **2:** sedimento del producto del homogenizado bacteriano al inicio del experimento; **3-7:** sedimentos producto del homogenizado bacteriano obtenido cada 30 minutos durante 2 horas y luego de 12 horas de incubación; **8:** sobrenadante del producto del homogenizado bacteriano al inicio del experimento; **9-13:** sobrenadantes producto del homogenizado bacteriano obtenido cada treinta minutos durante 2 horas y luego de 12 horas de incubación. La flecha roja señala la banda polipeptídica con una masa molecular aparente de 57 kDa, la cual se expresa durante la inducción con IPTG.

Como se muestra en la figura 11 (panel B, carriles 8-13), se observó la aparición a través del tiempo de una banda polipeptídica con una masa molecular aparente de 57 kDa, en las muestras correspondientes a los sobrenadantes obtenidos luego de la centrifugación del homogenizado celular del cultivo bacteriano al que se le adicionó IPTG. Este tamaño coincidió con el esperado para la proteína de interés en base a su secuencia de aminoácidos. También se apreció una mayor proporción de esta banda en la última muestra recolectada, luego de una incubación por 12 horas con el agente inductor (carril 13). En cambio, en las muestras correspondientes a los sobrenadantes del lisado celular del cultivo bacteriano al que no se le añadió IPTG (carriles 8-13, panel A, figura 11), no se observó dicha banda polipeptídica de 57 kDa. Tampoco se aprecia la mencionada banda en los carriles correspondientes al sedimento del homogenizado celular de los dos cultivos bacterianos (carriles 2-7, paneles A y B, figura 11).

Como se ilustra en la figura 12, en algunas oportunidades se observó que la banda polipeptídica de masa molecular estimada de 57 kDa se encontraba tanto en el sedimento como en el sobrenadante luego de la centrifugación del lisado celular (carriles 6 y 7, respectivamente, panel A). Además, la banda de 57 kDa migró con el mismo Rf que el de una muestra de la misma proteína purificada previamente en el laboratorio (carril 3). Mediante un inmunoblot, empleando anticuerpos monoclonales anti-polihistidina (panel B, figura 12), se confirmó que dicha banda correspondía a la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos.

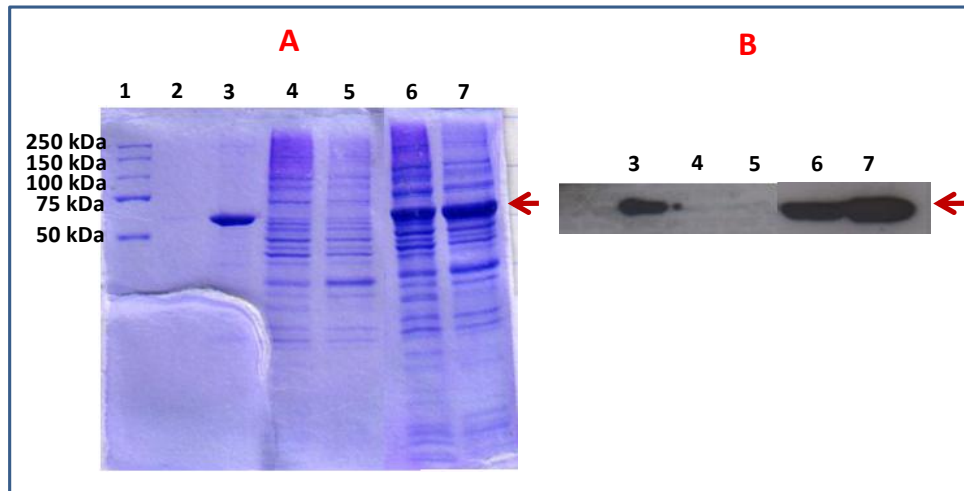


Figura 12: Perfil proteico del lisado celular de *E. coli* M15 antes y luego de inducir la expresión de la proteína de *Trypanosoma evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos recombinante.

(A) Gel de SDS-poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie. **(B)** Inmunotinción realizado con un anticuerpo anti-polihistidina. **1:** Patrón de masas moleculares (BIO-RAD); **2:** carril vacío; **3:** proteína recombinante control; **4:** sobrenadante control antes de inducir la expresión; **5:** sedimento control antes de inducir la expresión; **6:** sobrenadante control después de inducir la expresión; **7:** sedimento control después de inducir la expresión. La flecha roja señala la banda polipeptídica con un tamaño aparente de 57 kDa.

Sin embargo, en otras ocasiones, la proteína recombinante de interés fue detectada únicamente en la fracción particulada bacteriana (figura 13) y no en la fracción soluble. Es por ello, que se evaluaron distintos procedimientos de lisis celular para promover que la proteína recombinante estuviera en la fracción soluble y así asegurar que la proteína se encontrara en su estado nativo. Se emplearon tres muestras del cultivo bacteriano, las cuales fueron obtenidas empleando 1 mM de IPTG como agente inductor de la síntesis proteica. Las baterías resultantes fueron suspendidas en la solución NBB conteniendo 10 mM de Imidazol. A una de las tres muestras se le realizó un proceso repetido de congelamiento/descongelamiento, seguido de la adición de lisozima, y finalmente la muestra fue sonicada (carriles 2 y 3, figura 13). A una segunda muestra se le adicionó lisozima, seguido de un proceso de sonicación (carriles 4 y 5, figura 13). La última muestra solamente fue sonicada (carriles 6 y 7, figura 13). Adicionalmente, a fin de determinar si la concentración de IPTG tenía algo que ver con la ubicación de la proteína en la fracción soluble o particulada de la bacteria, se comparó el lisado celular obtenido a

partir de un cultivo bacteriano al que se le indujo la expresión de la proteína con una concentración final de 0,5 mM de IPTG en vez de 1 mM IPTG. En este caso, la muestra del cultivo bacteriano fue suspendida en la solución NBB conteniendo 10 mM de Imidazol, se le realizó un proceso repetido de congelamiento/descongelamiento, se le añadió lisozima y posteriormente fue sometida a sonicación (carriles 8 y 9, figura 13). En estas experiencias la sonicación aplicada fue de 10 pulsos con 10 segundos de duración con amplitud máxima e intervalos de 10 segundos de descanso, en frío.

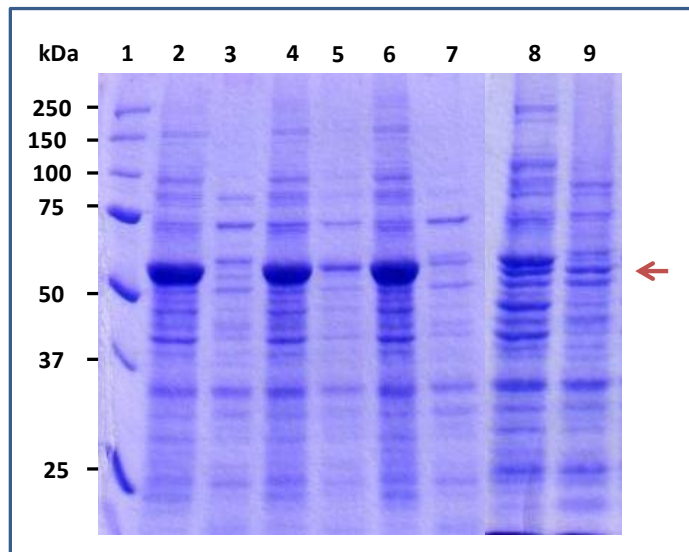


Figura 13: Efecto de distintos procedimientos empleados para el lisado celular.

La figura muestra geles de SDS-PAGE al 12%, teñidos con Azul de Coomassie. **1:** Marcadores de masas moleculares (BIO-RAD). En los experimentos ilustrados en los carriles 2-7, la expresión de la proteína fue inducida con 1 mM de IPTG. **2:** Sedimento y **3:** sobrenadante del lisado celular preparado mediante suspensión de las bacterias en NBB con 10 mM de Imidazol, congelamiento/descongelamiento, incubación con lisozima y homogenización por sonicación. **4:** sedimento y **5:** sobrenadante del lisado celular preparado mediante suspensión de las bacterias en NBB con 10 mM de Imidazol, incubación con lisozima y homogenización por sonicación. **6:** Sedimento y **7:** sobrenadante del lisado celular preparado mediante suspensión de las bacterias en NBB con 10 mM de Imidazol y homogenización por sonicación. En los experimentos ilustrados en los carriles 8 y 9, la expresión de la proteína fue inducida con 0,5 mM de IPTG. **8:** Sedimento y **9:** sobrenadante del lisado celular preparado mediante suspensión de las bacterias en NBB con 10 mM de Imidazol, congelamiento/descongelamiento, incubación con lisozima y homogenización por sonicación. La flecha roja señala la banda polipeptídica con un tamaño aparente de 57 kDa.

Como se ilustra en la figura 13, se observó que en todos los casos la banda polipeptídica correspondiente a la proteína recombinante de interés apareció mayoritariamente en la fracción particulada bacteriana (carriles 2, 4, 6 y 8, figura 13). Sólo en la muestra del cultivo bacteriano inducido con 1 mM de IPTG, y que fue preparado mediante suspensión de las bacterias en NBB con 10 mM de Imidazol, incubación con lisozima y homogenización por sonicación, se apreció una cantidad minoritaria de la banda polipeptídica de interés en la fracción soluble (carril 5, figura 13).

Seguidamente, se evaluó el efecto de la suspensión de los cultivos bacterianos en diferentes soluciones de lisis, designadas como A (carriles 3 y 4, figura 14) y B (carriles 5 y 6, figura 14), las cuales se diferenciaban por la concentración de NaCl en su composición. La suspensión bacteriana fue sometida a congelamiento/descongelamiento, incubación con lisozima y homogenización por sonicación. Como se observa en la figura 14, el uso de distintas soluciones durante la suspensión bacteriana no produjo que la proteína recombinante de interés se ubicara en la fracción soluble.

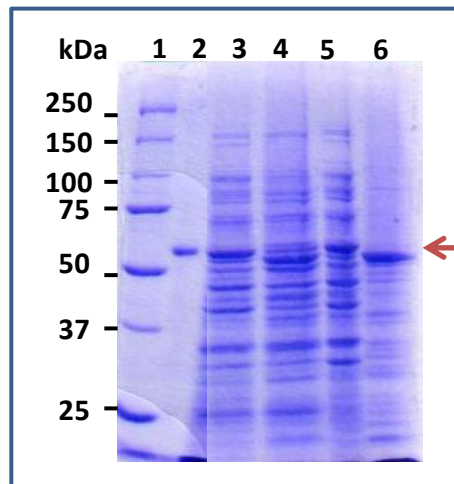


Figura 14: Efecto de la solución de lisis empleado durante el lisado celular.

La figura muestra un gel de SDS-PAGE al 12%, teñidos con Azul de Coomassie donde se corrieron las siguientes muestras: **1:** Patrón de masas moleculares (BIO-RAD). **2:** proteína recombinante control. **3:** Sedimento y **4:** sobrenadante del lisado celular en el que se suspendió el cultivo bacteriano en Buffer de lisis A. **5:** Sedimento y **6:** sobrenadante del lisado celular en el que se suspendió el cultivo bacteriano en Buffer de lisis B. La flecha roja señala la banda polipeptídica de tamaño aparente de 57 kDa.

Por último, se consideró aumentar el volumen de resuspensión de las bacterias cultivadas, previo a la homogenización por sonicación. Para ello, se creció un cultivo bacteriano de 4 L, en presencia de 0,5 mM IPTG, a 16 °C y por 12 horas. Las bacterias provenientes de dicho cultivo fueron resuspendidas en 200 mL de solución NBB conteniendo 10 mM de Imidazol. El volumen final fue fraccionado en cuatro alícuotas de 50 mL cada una, y cada alícuota fue sometida a sonicación por separado, empleando seis pulsos de 20 segundos de duración con amplitud máxima y con 30 segundos de pausa, en frío.

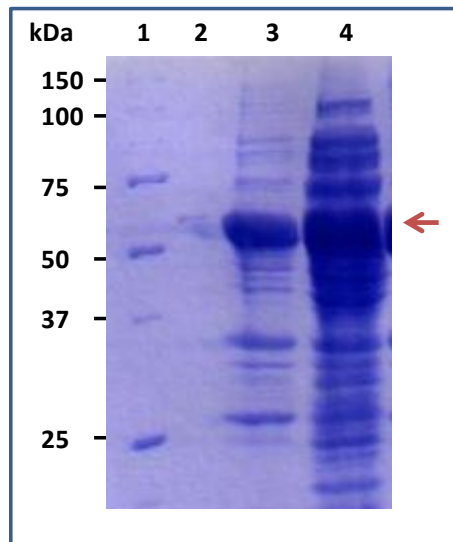


Figura 15: Efecto de la sonicación durante el lisado celular.

La figura muestra un gel de SDS-PAGE al 12%, teñidos con Azul de Coomassie, donde se corrieron las siguientes muestras: **1:** Patrón de masas moleculares (BIO-RAD). **2:** proteína recombinante control. **3:** Sedimento y **4:** sobrenadante del lisado celular luego de aumentar el volumen de resuspensión de las bacterias a 200 mL y sonicar las bacterias en alícuotas separadas de 50 mL cada una. La flecha roja señala la banda polipeptídica de tamaño aparente de 57 kDa.

Como se muestra en la figura 15, si bien aún se aprecia la proteína recombinante de interés en la fracción del sedimento (carril 3, figura 15), se volvió a apreciar una cantidad considerable de la proteína recombinante en la fracción soluble (carril 4, figura 15). A partir de estos resultados se determinó que la condición óptima para la homogenización de las bacterias consistía primero en suspenderlas en un volumen mayor de la solución de lisis, y posteriormente, dividir el volumen final en

varias alícuotas a fin de llevar a cabo el procedimiento de sonicación individualmente sobre cada una de las alícuotas.

5.2 Purificación de la proteína recombinante de *Trypanosoma evansi* que presenta homología con la subunidad reguladora de la PKA de mamíferos

La proteína recombinante fue purificada a partir del sobrenadante del cultivo bacteriano utilizando cromatografía de afinidad a iones de níquel. Durante la separación cromatográfica se recolectó lo que no se enlazó a la resina (carril 2, paneles B y C, figura 16), así como los lavados realizados a la resina con la solución NBB conteniendo 10 mM (carril 3, paneles B y C, figura 16). Finalmente, se recolectaron las fracciones eluidas luego de aplicar el gradiente de Imidazol, desde 100 hasta 500 mM de Imidazol (carriles 4-19, B y C, figura 16).

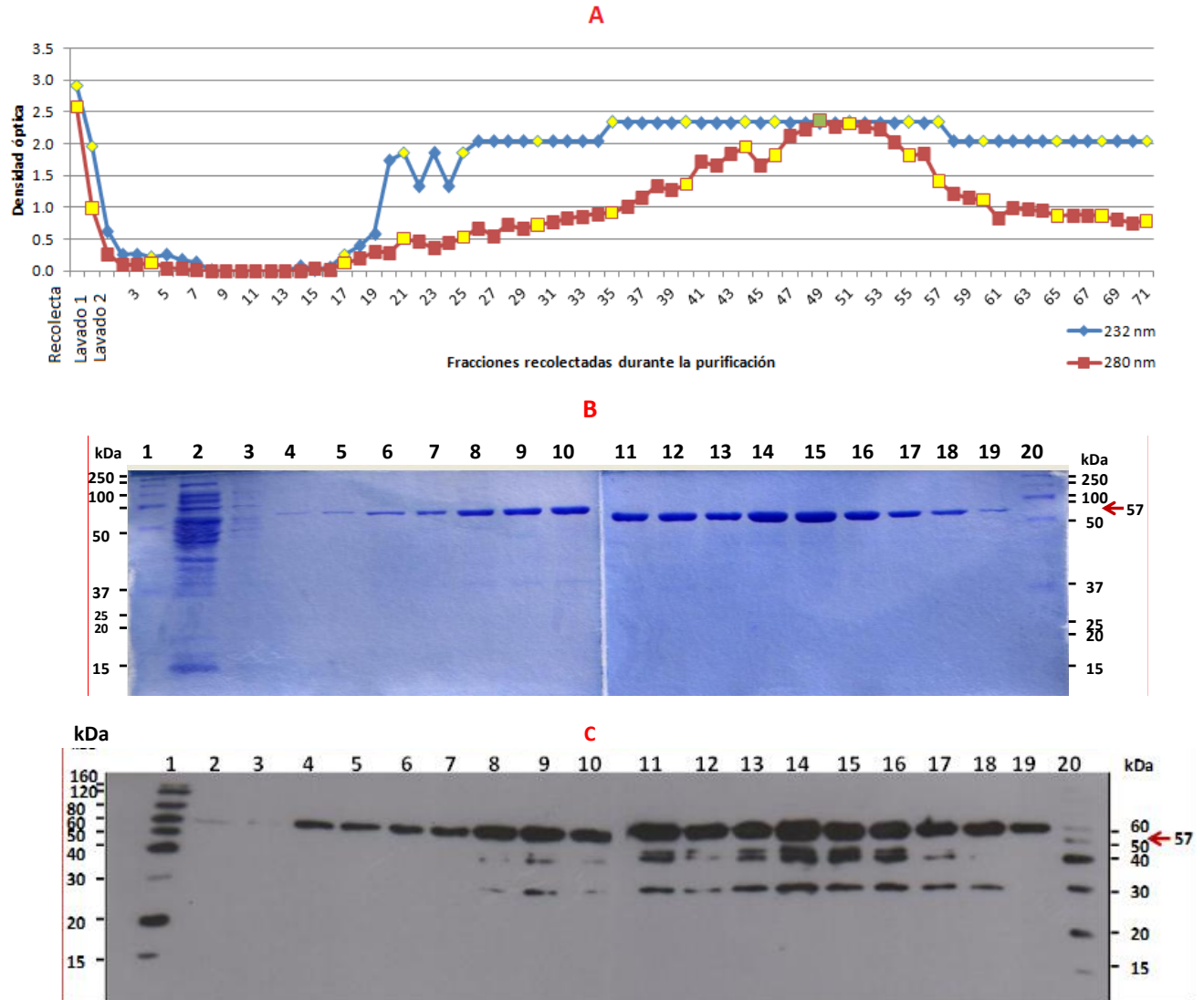


Figura 16: Análisis de la purificación de la proteína recombinante de interés mediante cromatografía de afinidad.

(A) Perfil de elución de la cromatografía de afinidad. Los puntos en amarillo representan aquellas fracciones analizadas en B y C. El punto en verde representa la mayor densidad óptica registrada en el gradiente. **(B)** Gel de SDS-poliacrilamida teñida con Azul de Coomassie de las fracciones recolectadas durante la purificación. **(C)** Inmunotinción con anticuerpos anti-polihistidina. **1 y 20:** Patrón de Masas Moleculares en **B:** de BIO-RAD y en **C:** de Invitrogen; **2:** Recolecta de lo que no se adsorbió a la columna; **3:** Lavado con 10 mM de Imidazol; **4-19:** fracciones recolectadas en la cromatografía de afinidad durante el gradiente de elución.

Como se ilustra en la figura 16 (panel A), a partir de la fracción 17 ocurre un incremento de la densidad óptica, registrándose un pico en la fracción 49 (punto verde en el perfil de elución) la cual alcanzó una densidad óptica de 2,365 a 280 nm. Este registro debe corresponder a la elución de aquellas proteínas enlazadas a la resina, las cuales fueron desplazadas por el gradiente de Imidazol utilizado.

En las fracciones analizadas por geles de poliacrilamida en presencia de SDS (puntos amarillos del perfil de elución), está presente un polipéptido de masa molecular aparente de 57 kDa (panel B, figura 16), tamaño que coincide con el esperado para la proteína de interés. En los carriles 13-16 del panel B de la figura 16, correspondientes a las fracciones 51-60, se observa un mayor contenido proteico de la banda polipeptídica mencionada. La tinción de proteínas con azul de Coomassie sugiere que la proteína fue purificada con una alta pureza (figura 16, panel B), puesto que no se observa la presencia de otras bandas polipeptídicas contaminantes.

Con un ensayo de Western blot utilizando anticuerpos anti-polihistidina (panel C, figura 16) se confirmó que dicha banda correspondía a la proteína recombinante de interés. Dado que este ensayo es más sensible que la tinción con azul de Coomassie, en la mencionada figura se pudieron detectar otras bandas de menor tamaño. Esto indicó que durante su purificación cromatográfica ocurrió cierta degradación de la proteína recombinante de interés.

En una oportunidad, luego de la cromatografía de afinidad descrita, se intentó realizar un paso adicional de purificación, el cual consistió de una cromatografía de intercambio aniónico con un grupo amino cuaternario. Previo a este paso de purificación, las muestras recolectadas fueron dializadas a fin de reemplazar la solución en la que se encontraba la proteína recombinante con una solución que fuera compatible con la cromatografía de intercambio aniónico. Sin embargo, como se aprecia en la figura 17, durante la diálisis ocurrió la formación de un precipitado que contenía la proteína recombinante de interés (carril 2, figura 17), y sólo una cantidad minoritaria de la proteína se mantuvo en su forma

soluble nativa (carril 3, figura 17). La proteína también se precipitó cuando fue concentrada por diálisis sobre una cama de polietilenglicol. Debido a esta pérdida de proteína que ocurrió durante la diálisis, no se observaron fracciones enriquecidas con la misma, luego de la cromatografía de intercambio aniónico (carriles 4-15, figura 17).

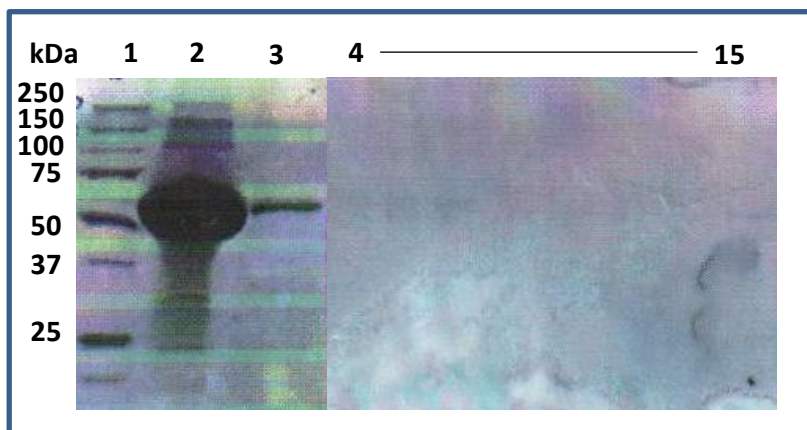


Figura 17: Intento de mejorar la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de intercambio aniónico. La figura muestra geles de SDS-PAGE al 12%, teñidos con SYPRO-Orange. **1:** Patrón de masas moleculares (BIO-RAD). **2:** contenido proteico del precipitado obtenido durante la diálisis. **3:** muestra que permaneció soluble luego de la diálisis. **4-15:** fracciones recolectadas en la cromatografía de intercambio aniónico durante el gradiente de elución.

Por ende, se omitió el paso de purificación mediante la cromatografía de intercambio iónico y se empleó la ultrafiltración como método de intercambio de solución y concentración de la proteína recombinante de interés. Mediante la ultrafiltración, se dializó y concentró la proteína a partir de las fracciones recolectadas durante la purificación con la columna de cromatografía de afinidad. Durante este procedimiento, no ocurrió la formación de precipitados. A través de la cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford (1976), se pudo determinar la concentración final de la proteína recombinante, la cual fue de 200,49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (r^2 de la curva standard = 0,999), por lo que se obtuvo una cantidad de 0,3 mg de proteína recombinante por litro de cultivo empleado durante la expresión. La figura muestra la pureza de la proteína obtenida luego de la ultrafiltración (carril 3, figura 18).

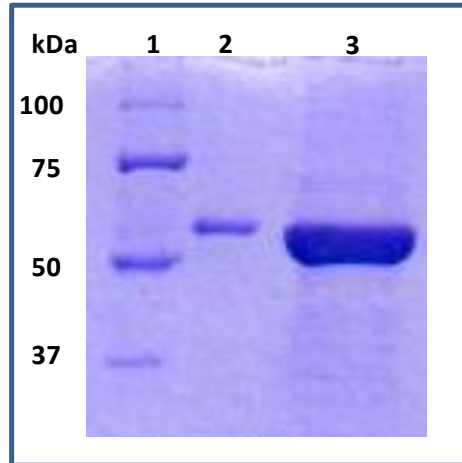


Figura 18: Concentración por ultrafiltración de la proteína recombinante a partir de las fracciones recolectadas durante la cromatografía de afinidad.

La figura muestra un gel de SDS-PAGE al 12%, teñido con Azul de Coomassie, donde se corrieron alícuotas de la proteína recombinante concentrada. **1:** Patrón de masas moleculares (BIO-RAD). **2:** proteína recombinante control. **3:** contenido proteico de la muestra ultrafiltrada.

5.3 Digestión parcial de la proteína recombinante de interés mediante proteasas

A fin de analizar si la proteína recombinante poseía una región bisagra susceptible a cortes discretos con enzimas proteolíticas y con ello generar polipéptidos que pudieran ser empleados durante los ensayos de interacción, se estudió el efecto de la digestión parcial de la proteína recombinante con distintas relaciones de proteasa:proteína. En estos experimentos se emplearon las siguientes proteasas: quimotripsina, termolísina y tripsina (A, B y C, respectivamente, figura 19).

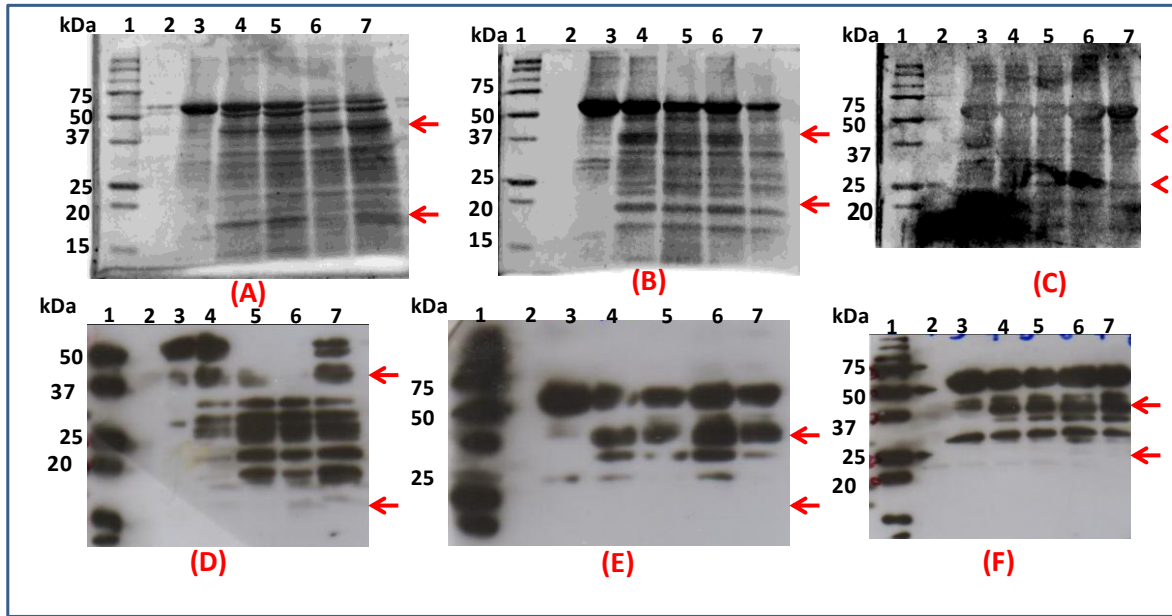


Figura 19: Análisis de la digestión parcial de la proteína recombinante con distintas relaciones entre proteasa:proteína. La figura muestra geles de SDS-PAGE al 12%, teñidos con Azul de Coomassie (A-B) y ensayos de inmunotinción revelados con el anticuerpo anti-polihistidina (D-E). (A), (D): Incubación con 3: sólo proteína recombinante, 4: 1:500, 5: 1:200, 6: 1:100 y 7: 1:50 de Quimotripsina por 30 minutos a 4 °C. (B), (E): Incubación con 3: sólo proteína recombinante, 4: 1:100, 5: 1:50, 6: 1:20 y 7: 1:10 de Termolisina por 30 minutos a temperatura ambiente. (C), (F): Incubación con 3: sólo proteína recombinante, 4: 1:1000, 5: 1:500, 6: 1:200 y 7: 1:100 de Tripsina por 30 minutos a 4 °C. 1: Patrón de masas moleculares (BIO-RAD).

En los paneles A, B y C de la figura 19, se observa que la banda polipeptídica de 57 kDa correspondiente a la proteína recombinante disminuye a medida que aumenta la cantidad empleada de proteasa. Esto se debe a que está siendo hidrolizada parcialmente en polipéptidos que, por lo general, incrementan en número y en cantidad a medida que la concentración de la proteasa en el ensayo es mayor. Adicionalmente, en la figura 19, se aprecia que existen productos proteolíticos de masas moleculares aparentes similares. Principalmente, se observaron dos bandas polipeptídicas, una de ellas con una masa molecular mayor estimada en 45 kDa (panel A), 39 kDa (panel B) y 36 kDa (panel C); y una banda de menor tamaño con una masa molecular aparente de 19 kDa en A, de 19, 5 kDa en B y 20,6 kDa en C (flechas rojas de la figura 19). En la inmunotinción revelada con anticuerpos anti-polihistidina (paneles D, E y F, figura 19) se confirma que si bien existen varios productos proteolíticos que contienen la región rica en los residuos de histidina, las bandas proteolíticas de menor tamaño (19 kDa en A, de 19,

5 kDa en B y 20,6 kDa en C) no corresponden a la región C-terminal de la proteína pues dichos fragmentos no son reconocidos por el anticuerpo anti-polihistidina. Esto demuestra que la banda polipeptídica de mayor tamaño corresponde a la región C-terminal de la proteína. Aun así, mediante la proteólisis limitada no fue posible generar tan solo estos dos fragmentos proteolíticos estables, sino una gran cantidad de bandas polipeptídicas, por lo que no fue posible su empleo durante los ensayos de interacción realizados posteriormente.

5.4 Purificación de parásitos de *Trypanosoma evansi*

No existen medios axénicos para el crecimiento en cultivo de *T. evansi*, por lo que se empleó un protocolo para la obtención de estos parásitos basado en la inoculación y expansión de *T. evansi* en ratas blancas de experimentación (Lahman y Godfrey, 1970).

Se infectaron cuatro ratas con criopreservados del aislado Teva1 de *T. evansi* para la obtención en sangre de este tripanosomatidio, los cuales fueron separados del resto de los componentes sanguíneos mediante centrifugación y cromatografía aniónica a través de una resina de DEAE celulosa. Esta resina de intercambio aniónico débil interacciona con los componentes celulares de la sangre provenientes de la rata, como los glóbulos rojos y blancos, permitiendo de esta forma la separación del tripanosomatidio de estos componentes celulares.

En esta experiencia se obtuvo una cantidad de $1,164 \times 10^{10}$ parásitos/mL en un volumen de elución de 80 mL, a partir de 60 mL de sangre proveniente de 4 ratas infectadas.

5.5 Ensayo de interacción proteína – proteína

A fin de analizar si la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad R de la PKA era capaz de interactuar con otras proteínas del parásito, se determinó si alguna(s) de las proteínas presentes en la fracción soluble y particulada de *T. evansi* podía(n) enlazarse de manera específica a la proteína recombinante unida a la columna de afinidad de iones de níquel.

En las figuras 20 y 21 se ilustran los enlazamientos ocurridos entre estas proteínas. En los ensayos de interacción realizados con la fracción soluble (figura 20) y la fracción particulada de *T. evansi* (figura 21), se aprecian bandas polipeptídicas adicionales a la banda que corresponde a la proteína recombinante de interés, ésta última puede ser apreciada en las figuras (carriles 8, figura 20 y 21), ya que la adición de la solución de la muestra para proteínas a los ensayos realizados, ocasionó la ruptura del enlazamiento existente entre la proteína recombinante y la resina de iones de níquel. Como control, se realizó un experimento de ensayo de interacción similar en ausencia de la proteína recombinante (extremo izquierdo de las figuras 20 y 21), lo que permitió la determinación de los enlazamientos inespecíficos que pudiesen ocurrir entre las proteínas de la fracción soluble o de la fracción particulada de *T. evansi* con la resina.

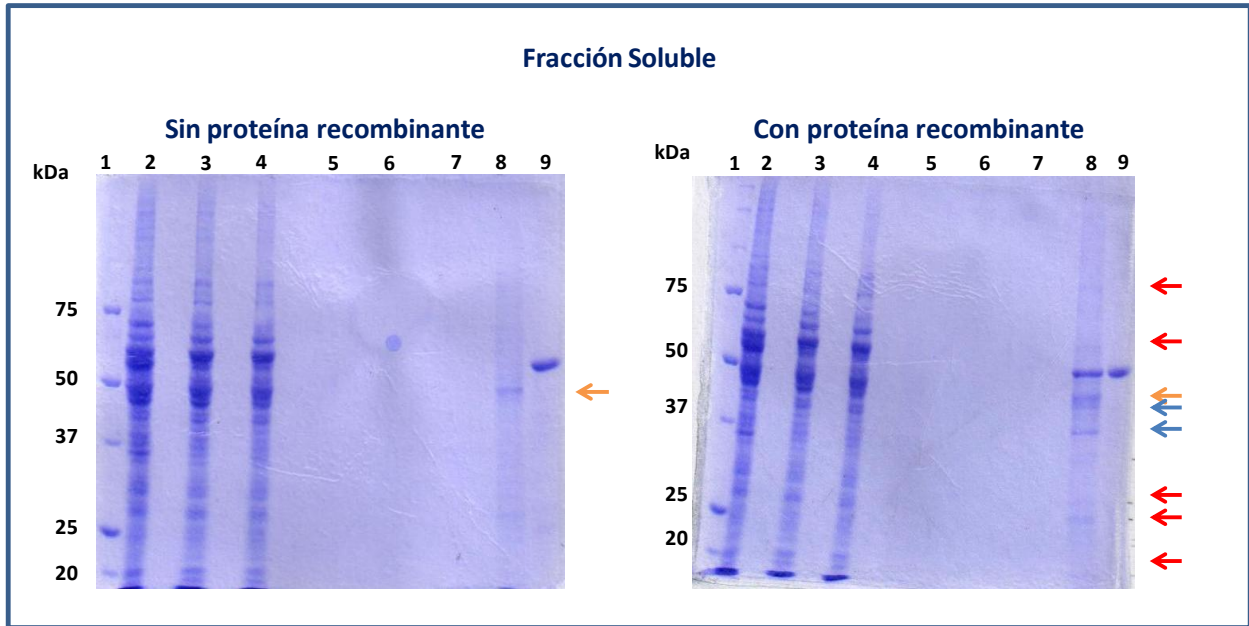


Figura 20: Análisis del ensayo de interacción proteína-proteína realizado con la fracción soluble del parásito. Geles de SDS-poliacrilamida al 8% teñidos con azul de Coomassie de las muestras recolectadas en el ensayo de interacción. **Leyenda.** **Izquierda:** Ensayos realizados con la resina sin tener acoplada la proteína recombinante. **Derecha:** Ensayos realizados con la resina la cual tiene enlazada a la proteína recombinante. **1:** Patrón de Masas Moleculares (BIO-RAD). **2:** Homogenizado celular de *Trypanosoma evansi*. **3:** Fracción soluble de *Trypanosoma evansi*. **4:** lo que no se enlazó a la resina ni a la proteína recombinante. **5:** Lavado con NBB. **6:** Lavado con NBB 10 mM de Imidazol. **7:** Lavado con NBB 10 mM de Imidazol. **8:** resina + (sin o con proteína recombinante) + fracción soluble del parásito. **9:** proteína recombinante control.

En el ensayo realizado con la proteína recombinante enlazada a la resina con la fracción soluble del *T. evansi*, se observaron bandas que tienen una masa molecular estimada de 46 kDa, 44,6 kDa y una de 37,6 kDa (flechas azules de la figura 20). Por otro lado, se observaron bandas polipeptídicas de menor intensidad con masas moleculares estimadas de 80,6 kDa, 63 kDa, 32,5 kDa, 28,2 kDa, 26,6 kDa y 20 kDa (flechas rojas de la figura 20). La banda de masa molecular de 44,6 kDa (flechas anaranjadas de la figura 20) parece ser un enlazamiento inespecífico ocasionado entre la fracción soluble del parásito con la resina, ya que esta banda se aprecia en el ensayo de interacción realizado carente de la proteína recombinante de interés (carril 8, extremo izquierdo de la figura 20).

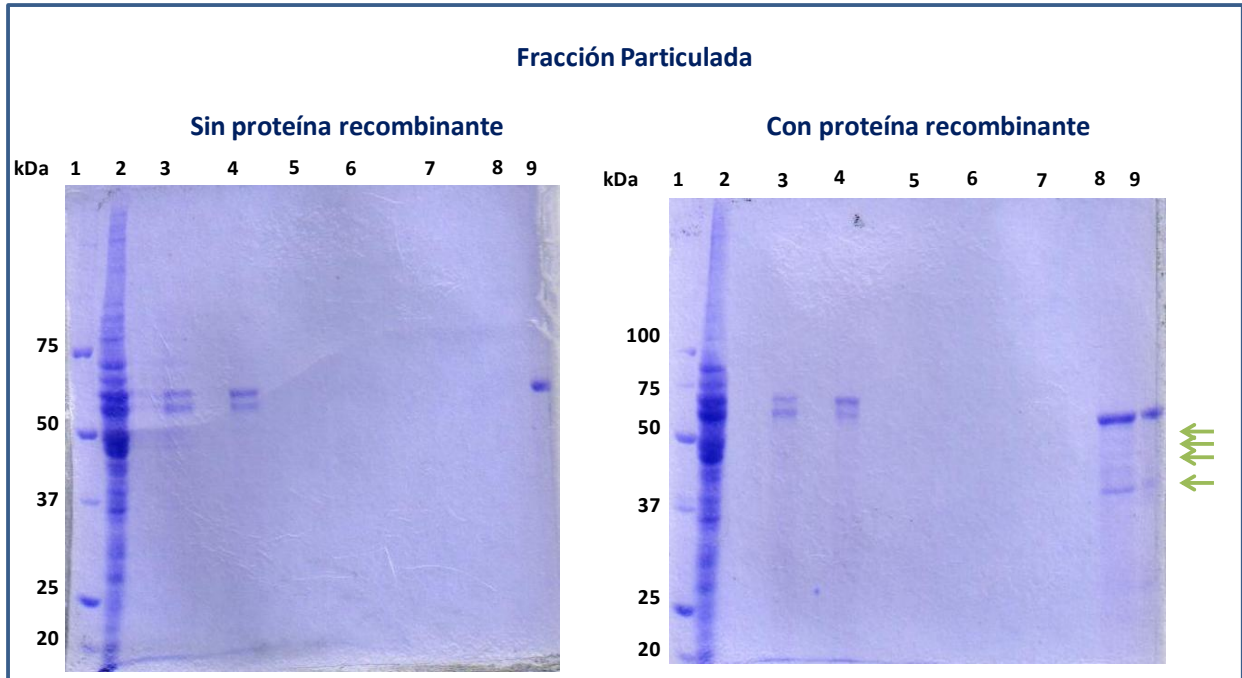


Figura 21: Análisis del ensayo de interacción proteína-proteína realizado con la fracción particulada del parásito. Geles de SDS-poliacrilamida al 8% teñidos con azul de Coomassie de las muestras recolectadas en el ensayo de interacción. **Leyenda. Izquierda:** Ensayos realizados con la resina sin tener acoplada la proteína recombinante. **Derecha:** Ensayos realizados con la resina la cual tiene enlazada a la proteína recombinante. **1:** Patrón de Masas Moleculares (BIO-RAD). **2:** Homogenizado celular de *Trypanosoma evansi*. **3:** Fracción particulada de *Trypanosoma evansi*. **4:** lo que no se enlazó a la resina ni a la proteína recombinante. **5:** Lavado con NBB. **6:** Lavado con NBB 10 mM de Imidazol. **7:** Lavado con NBB 10 mM de Imidazol. **8:** resina + (sin o con proteína recombinante) + fracción particulada del parásito. **9:** proteína recombinante control.

Con respecto al ensayo de interacción realizado con la fracción particulada de *T. evansi* (figura 21), se observa la presencia de una banda de masa molecular estimada de 35,5 kDa, tamaño que coincide con una de las bandas presentes en el ensayo realizado con la fracción soluble de *T. evansi*. Aunque esta banda no se aprecia en la fracción particulada (carril 3, figura 21), esta técnica de cromatografía permite concentrar las proteínas presentes en dicha fracción. Adicionalmente, se aprecia con menor intensidad la presencia de otras tres bandas de masa molecular estimada de 40 kDa, 40,9 kDa y 42,2 kDa (flecha verdes, extremo derecho, figura 21). Estas bandas no corresponden a enlazamientos inespecíficos ocurridos con la resina, ya que no se observa el enlazamiento de ningún polipéptido en la resina (figura 21).

Mediante una inmunotinción, empleando anticuerpos policlonales anti-reguladora de *T. evansi* recombinante (figura 22), se confirmó que estas bandas no son productos de la degradación de la proteína recombinante, ya que sólo se observa la banda correspondiente a esta proteína (carriles 6 y 9, paneles A y B, figura 22).

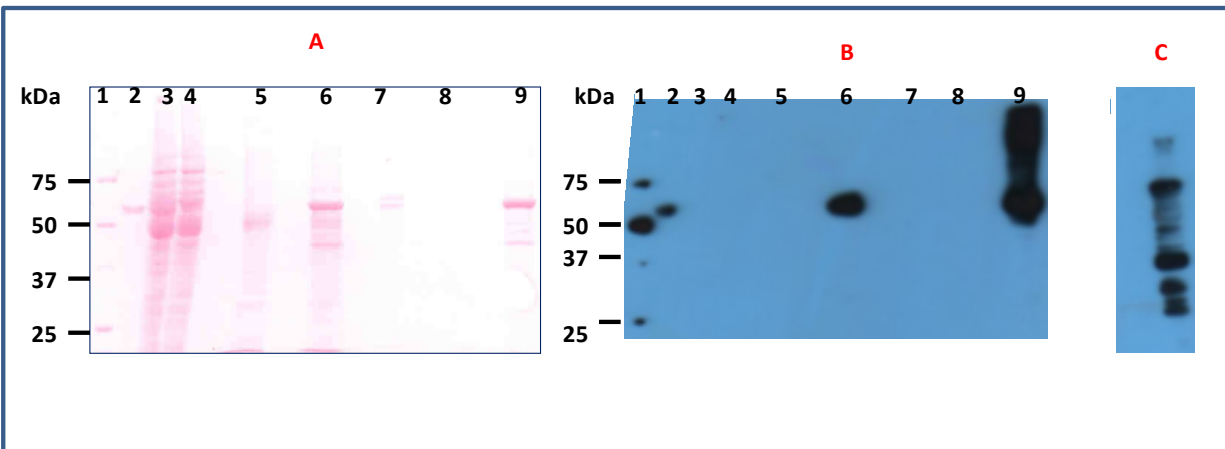


Figura 22: Análisis del ensayo de interacción proteína-proteína mediante inmunotinción.

La figura muestra la membrana de nitrocelulosa teñida en Ponceau's (A) y su respectivo ensayo de inmunotinción revelado con el anticuerpo anti-reguladora (B). En (C) se muestra un ensayo de inmunotinción revelado con el anticuerpo anti-reguladora de una proteólisis limitada de la proteína recombinante realizada con quimotripsina. **Leyenda.** 1: Patrón de masas moleculares (BIO-RAD). 2: Proteína recombinante control, 3: homogenizado celular de *Trypanosoma evansi*. 4: Fracción soluble de *Trypanosoma evansi*. 5: Resina + fracción soluble del parásito. 6: Resina + fracción soluble del parásito + proteína recombinante. 7: Fracción particulada de *Trypanosoma evansi*. 8: Resina + fracción particulada del parásito. 9: Resina + fracción particulada del parásito + proteína recombinante.

Como se observa en el panel C de la figura 22, el anticuerpo anti-reguladora es capaz de reconocer los fragmentos que se originan por proteólisis, por lo que debe ser capaz también de reconocer, si existiese, la degradación proteolítica de la proteína recombinante.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los procedimientos experimentales empleados permitieron determinar las condiciones óptimas para la expresión en bacterias, de la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos. El hecho de que la proteína recombinante fuera encontrada principalmente en la fracción soluble bacteriana sugiere que esta proteína es soluble en su estado nativo, y por lo tanto, que debe ubicarse en el citoplasma celular del parásito. Sin embargo, hubo ocasiones en las que parte de la proteína recombinante se ubicó en la fracción particulada bacteriana. Esto, probablemente, debido a la elevada cantidad de proteína recombinante expresada luego de ser inducida, razón por la cual puede no haber ocurrido el ensamblaje correcto de la proteína recombinante, por lo que puede haberse asociado intermolecularmente con otras proteínas, conociéndose esta asociación como cuerpos de inclusión, que son agregados insolubles formados dentro de la bacterias. Todo lo cual pudo haber ocasionado la migración de la proteína recombinante a la fracción particulada bacteriana. De manera similar, las subunidades R de las PKAs de organismos eucarióticos superiores y de otros tripanosomatidios como *T. cruzi* (Huang y col., 2006), también son solubles. Bajo las condiciones conseguidas, la proteína recombinante debe mantener sus características propias de estructura y función, lo que garantiza que la proteína pueda ser adecuadamente estudiada en investigaciones futuras.

Seguidamente, se pudo purificar una elevada cantidad de la proteína recombinante, partiendo del contenido proteico presente en la fracción soluble bacteriana. Esto se realizó mediante métodos cromatográficos con la resina Probond de níquel. Con el empleo de los lavados de concentraciones de 10 mM y 100 mM de Imidazol, fue posible eliminar el contenido bacteriano que no se enlazó a la resina de níquel, así como enlazamientos inespecíficos que pudieron haber ocurrido entre la resina y las proteínas presentes en la fracción soluble bacteriana que pueden contener residuos de histidina.

Mientras que el empleo de un gradiente de elución con concentración creciente de Imidazol de 100 mM a 500 mM, permitió la recolección de fracciones enriquecidas de la proteína recombinante.

La realización de un paso adicional a la purificación de la proteína recombinante mediante una cromatografía de intercambio aniónico con la resina de grupo amino cuaternario, ocasionó una pérdida importante de la proteína en su forma soluble. Previo a esta purificación fue necesario dializar a fin de eliminar la cantidad de sales presentes en las fracciones enriquecidas de la proteína recombinante, obtenidas de la cromatografía de afinidad de iones de níquel. Sin embargo, en esta diálisis ocurrió la precipitación de la proteína recombinante, esto pudo haber sido producto del efecto de las interacciones iónicas sobre la proteína recombinante durante la diálisis. Probablemente, en este procedimiento ocurrió un cambio de concentración de sales que ocasionaron la disminución de la solubilidad de la proteína recombinante, lo que ocasionó su precipitación (Mathews y col., 2006). En consecuencia, se omitió esta metodología. Alternativamente, se procedió a ultrafiltrar la muestra con el fin de reemplazar la solución en la que se encuentra soluble y a su vez concentrarla.

La proteólisis específica y limitada puede resultar una herramienta útil para la caracterización de la estructura de los dominios de la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos. Aunque se observó cierta similitud en el patrón de fragmentos obtenido al emplear las distintas proteasas, las condiciones empleadas ocasionaron la formación de numerosos productos proteolíticos. De este patrón, se pudo establecer que el fragmento proteolítico de mayor tamaño, de masa molecular promedio de 40 kDa, contiene el extremo carboxilo terminal de la proteína, mientras que el fragmento proteolítico de menor tamaño, de masa molecular promedio de 19,5 kDa, contiene el extremo amino terminal. El patrón de digestión observado fue similar al descrito para las subunidades RI como de las RII de las PKAs de mamífero (Potter y Taylor, 1979^a, 1979^b y 1980), en las cuales se evidencia la presencia de una región bisagra que es muy susceptible a proteolisis. La digestión

limitada de las subunidades R de las PKAs de mamíferos produce claramente dos fragmentos, uno de mayor tamaño que corresponde al dominio COOH-terminal que posee los dos sitios de enlazamiento de AMPc y uno de menor tamaño que representa el dominio NH₂-terminal, el cual contiene la región D/D de anclaje y dimerización, así como el sitio de reconocimiento para la subunidad catalítica de la PKA (Potter y Taylor, 1979^a). A pesar de que con la proteína recombinante se obtuvo una fragmentación suficientemente reproducible al utilizar las diferentes proteasas, dicha fragmentación no ocurrió de manera estequiométrica, y no se lograron precisar las condiciones experimentales que permitiesen la obtención exclusiva de sólo dos fragmentos proteolíticos. En cambio, pareciera que la digestión parcial produjo cierta pérdida de la estructura de la proteína, con la concomitante exposición de otras regiones susceptibles a proteólisis y, por ende, se dificultó la obtención de fragmentos proteolíticos discretos. Como recomendación alternativa, se sugiere generar estos dos fragmentos polipeptídicos mediante técnicas de biología molecular, y de esta forma se podrían obtener fragmentos truncados que ayudarían a determinar los dominios de esta proteína del parásito y su posible función.

Se logró purificar a *T. evansi* cromatográficamente con la resina de DEAE celulosa, a partir de ratas infectadas, reproduciéndose el protocolo descrito por Lahman y Godfrey (1970), debido a la inexistencia de medios axénicos que permitiesen el cultivo *in vitro* de *T. evansi* (Lahman y Godfrey, 1970). A partir de los parásitos purificados, se obtuvo el homogenato celular de *T. evansi* mediante sonicación, el cual fue separado por centrifugación en fracción soluble y fracción particulada. El procedimiento empleado fue similar al trabajo publicado referente a la identificación de actividad quinasa presente en estas fracciones de *T. evansi* (Galán-Caridad y col., 2004).

La evaluación de la interacción de la proteína recombinante con otras proteínas presentes en *T. evansi*, a través del ensayo de interacción por técnicas cromatográficas y de su análisis en geles de SDS-poliacrilamida, demostró que la proteína recombinante fue capaz de enlazar proteínas presentes en la

fracción soluble y la fracción particulada de los parásitos. No obstante, sólo se pudo identificar la masa molecular aparente de las bandas polipeptídicas provenientes de las proteínas que interaccionan con la proteína recombinante. En este sentido, ya se tienen previstas investigaciones futuras que permitirán identificar cuáles proteínas son las que están involucradas en estas interacciones. Esto se llevará a cabo en colaboración con la Dra. Eva Vonasek del Departamento de Biología Estructural del IVIC, quien nos permitirá secuenciar las proteínas enlazadas a la proteína recombinante por métodos de espectrometría de masas.

La región amino terminal de la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamífero, puede estar involucrada en la interacción con otras proteínas, tal como se determinó en el modelaje tridimensional realizado en programas bioinformáticos (Bubis, comunicación personal). Por lo que los resultados obtenidos fortalecen la hipótesis planteada, ya que en ellos se demuestran que ciertas proteínas presentes en el parásito se enlazan con la proteína recombinante. Además, se ha descrito que en esta región amino terminal de la proteína en estudio tiene un sitio de reconocimiento de la subunidad C (Bubis, comunicación personal), al igual que está presente en la subunidad R putativa de *T. brucei* (Shalaby y col., 2001). En *T. brucei*, además, se ha descrito que las subunidades C existentes tienen masas moleculares de: 37,909 kDa (GenBank, número de acceso: Tb09.211.2410), 38,438 kDa (Tb09.211.2360) y 39,052 kDa (Tb10.389.0490), tamaños que se asemejan a la banda de 36 kDa obtenida en el ensayo de interacción realizado. Por lo que esto sugiere que la proteína recombinante pudiese enlazar a una subunidad C putativa presente en *T. evansi*.

Adicionalmente, en *T. evansi*, se ha descrito la existencia de PKs capaces de fosforilar substratos endógenos (Galán-Caridad y col., 2004). Mediante la fosforilación de substratos específicos como la caseína y el kémptido, estos autores describieron la presencia de caseínas quinasa en la fracción particulada y de PKs dependientes de nucleótidos cíclicos en la fracción soluble de este

tripanosomatidio. La fosforilación de sustratos endógenos fue inhibida con la adición de PKI, un inhibidor específico de las PKAs. La masa molecular estimada de los sustratos endógenos fosforilados en la fracción soluble de *T. evansi* fueron de 156 kDa, 80 kDa, 55 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa y 20 kDa (Galán-Caridad y col., 2004). Es posible que alguno o algunos de estos sustratos endógenos sean fosforilados mediante PKAs putativas de *T. evansi* y si se sujeta la hipótesis de que la proteína que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos está asociada al anclaje de las subunidades C de las PKAs de *T. evansi* con sus sustratos específicos a ser fosforilados, probablemente una de estas proteínas interaccionan con la proteína recombinante de interés. Los sustratos endógenos de 80 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa y 20 kDa poseen masas moleculares similares a las bandas polipeptídicas obtenidas durante el ensayo de interacción.

A través del ensayo de interacción de proteínas empleando el sistema de dos híbridos en levadura, se han descrito al menos ocho sustratos que interaccionan con la subunidad C putativa de la PKA de *T. cruzi* y que son fosforilados por dicha proteína (Bao y col., 2008). Se ha identificado que esta subunidad C putativa fosforila a otras PKs, como las fosfatidilinositol quininas: PI3K (127 kDa) y la Vps34 (113 kDa); la PK homóloga a las proteínas quininas de regulación de señales extracelulares o ERK (56 kDa) y una hexoquinasa putativa (58 kDa), así como también fosforila a la fosfodiesterasa PDEC2 (113 kDa), la proteína de reparación por escisión del ADN o DERP (130 kDa), una acuaporina (30 kDa) y una ATPasa putativa (26 kDa). La PI3K y la Vps 34 regulan funciones celulares asociadas con el crecimiento, la proliferación, la motilidad, la diferenciación y el tráfico celular. La hexoquinasa está involucrada en el metabolismo celular del parásito, y el resto de las proteínas mencionadas están involucradas en la adaptación de *T. cruzi* a alteraciones del entorno (Bao y col., 2008). La masa molecular de la hexoquinasa, la acuaporina y la ATPasa parecen corresponder con las bandas de 20 kDa, 28 kDa y 63 kDa obtenidas que interaccionan con la proteína recombinante.

Seguidamente, Bao y colaboradores (2009), una vez más mediante el sistema de dos híbridos y empleando técnicas de inmunoprecipitación, identificaron en *T. cruzi* una interacción entre una Na⁺ ATPasa y la subunidad R putativa, siendo la primera proteína en identificarse que interacciona con la subunidad R putativa de *T. cruzi*. Las ATPasas son proteínas de membranas que transportan iones específicos, estos contienen motivos conservados solubles en la región citoplasmática. Con estas evidencias, estos autores enunciaron que en la fase tripomastigotes de *T. cruzi* la subunidad R putativa permanece asociada a la membrana, en cercanía al flagelo, por medio de este enlazamiento. Esto pudiera regular la fosforilación de proteínas involucradas en la invasión o en la adaptación (Bao y col., 2009). Las masas moleculares de las ATPasas que enlazaron con la subunidad R de *T. cruzi* tienen una masa molecular de 120 kDa y 140 kDa. Sin embargo, se han descrito ATPasas putativas de masa molecular de 20 kDa (Bao y col., 2008), la cual tiene un tamaño similar a la banda de 20 kDa obtenida en el ensayo de interacción realizado.

En organismos eucarióticos superiores, las PKs han sido estudiadas para la identificación de blancos terapéuticos con la finalidad de diseñar drogas farmacéuticas, debido a su importancia en la regulación de numerosos eventos celulares (Naula y Seebeck, 2000). Los numerosos dominios presentes en las PKAs de mamíferos sirven como blancos terapéuticos para poder interrumpir su mecanismo de señalización, lo que ha resultado ser un prototipo para generar diversas estrategias de diseño de inhibidores (Taylor y col., 2008). La subunidad R de mamífero tiene numerosos dominios que interaccionan con una variedad de proteínas (Taylor y col., 2008), entre ellas: otra subunidad R, la subunidad C y las proteínas AKAPs. Lo que sugiere una gran variedad de interacciones entre proteínas que son mediadas en estas proteínas y es un reflejo de lo que se pudo determinar con la proteína recombinante, por su enlazamiento con otras proteínas presentes en el parásito.

Por otro lado, la proteína de interés es 100% idéntica en secuencia a la subunidad R de la PKA putativa de *T. brucei*. Está formada por 499 residuos de aminoácidos, no fue detectada su dimerización, presenta homología con la subunidad R de la PKA I de mamíferos y presenta sustituciones en residuos de aminoácidos que son esenciales para el enlazamiento de nucleótidos cíclicos (Shalaby y col., 2001). Por lo que toda la información recolectada de los estudios realizados con la proteína de interés pudiesen ser también útiles para la búsqueda de blancos terapéuticos de su proteína homóloga en *T. brucei*, el agente causal de la enfermedad del sueño en África.

7. CONCLUSIONES

- Se optimizaron las condiciones empleadas durante la expresión en bacterias de la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos. La proteína recombinante fue obtenida en forma soluble y en grandes cantidades.
- La proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos fue purificada a homogeneidad por cromatografía de afinidad a través de una columna formada por una resina con iones de níquel. La pureza de la proteína fue comprobada por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, observándose una única banda polipeptídica con una masa molecular aparente de aproximadamente 57 kDa. Se estimó que se obtuvo una cantidad de 0,3 mg de proteína recombinante por litro de cultivo empleado durante la expresión.
- Se expandieron parásitos *T. evansi* del aislado Teva 1 en ratas de experimentación, y los parásitos fueron purificados a partir de la sangre de las ratas infectadas mediante cromatografía de intercambio aniónico a través de columnas de DEAE-celulosa. Los parásitos fueron homogenizados, y mediante ultracentrifugación se logró la separación de la fracción soluble o citoplasmática y la fracción particulada o de membrana de dichos parásitos. Las proteínas presentes en estas fracciones fueron utilizadas para analizar su posible interacción con la proteína recombinante.
- Mediante técnicas de cromatografía de afinidad, se demostró que la proteína de *T. evansi* que presenta homología con la subunidad R de la PKA de mamíferos, interacciona con otras proteínas presentes en este parásito. Las proteínas presentes en la fracción soluble del parásito que se enlazaron con la proteína recombinante tienen una masa molecular estimada de: 46 kDa, 37,6 kDa, 80,6 kDa, 63 kDa, 32,5 kDa, 28,2 kDa, 26,6 kDa y 20 kDa. Mientras que las

proteínas de la fracción particulada de *T. evansi* que se enlazaron con la proteína recombinante tienen una masa molecular estimada de: 40 kDa, 40,9 kDa, 42,2 kDa y 35,5 kDa.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Bao, Y., Weiss, L., Braunstein, V., Huang, H. 2008. Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*. *Infect immune*. **76 (10)**: 4757-4763.
- Bao, Y., Weiss, L., Hashimoto, M., Nara, T., Huang, H. 2009. Short report: proteina kinase A regulatory subunit interacts with P-type ATPases in *Trypanosoma cruzi*. *Am Soc Trop Med Hyg*. **80(6)**: 941-943.
- Berlin, D., Loeb, E., Baneth, Gad. 2009. Disseminated central nervous system disease caused by *Trypanosoma evansi* in a horse. *Vet Parasitol*. **161**: 316-319.
- Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler C., Blandin G., Renauld H., Bartholomeu D., Lennard N., y colaboradores. 2005. The genome of African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. **309**: 416-422.
- Biswas, D., Choudhury, A., Misra, K. 2001. Histopathology of *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* infection in Bandicoot rat. I. Visceral organs. *Exp Parasitol*. **99**: 148-159.
- Canelón, J., Meléndez, R. 2003. Posible origen del *Trypanosoma evansi* en Venezuela. *Vet Trop*. **28 (2)**: 155-167.
- Daniels, J., Gull, K., Wickstead, B. 2010. Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol Mol Biol R*. **74 (4)**: 552-569.
- El-Sayed N., Myler P., Bartholomeu D., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A., Ghedin E., y colaboradores. 2005. [The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease.](#) *Science*. **309(5733)**:409-15.
- Galán-Caridad, J., Calabokis, M., Uzcanga, G., Aponte, F., Bubis, J. 2004. Identification of casein kinase 1, casein kinase 2, and cAMP-dependent protein kinase-like activities in *Trypanosoma evansi*. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. **99(8)**: 845-854.
- Golemis, E., Adams, P. 2005. Protein-protein interactions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, segunda edición, Nueva York, Estados Unidos.
- González, R. 2001. La morfometría de *Trypanosoma evansi* y sus implicaciones hematológicas en infecciones experimentales. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Gould, M., de Koning. 2010. Cyclic-nucleotide signaling in protozoa. *FEMS Microbiol Rev*. **35**: 515-541.
- Haile, S., Papadopoulou, B. 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol*. **10**: 569-577.
- Hanks, S., Hunter, T. 1995. The eukariotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*. **9**: 576-596.

- Herrera, H., Rocha, F., Lisboa, C., Rademaker, V., Mourão, G., Jansen, A. 2011. Food web connections and the transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. *T Roy Soc Trop Med H.* **105**: 380-387.
- Hoare, C. 1972. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford Blackwell Scientific publications, Primera edición, Londres, Inglaterra.
- Huang, H., Weiss, L., Nagajyothi, F., Tanowitz, H., Wittner, M., Orr, G., Bao, Y. 2006. Molecular cloning and characterization of the protein kinase A regulatory subunit of *Trypanosoma cruzi*. 2006. *Mol Biochem Parasit.* **149**: 242-245.
- Ivens A., Peacock C., Worthey E., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., y colaboradores. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.* **309 (5733)**:436-42.
- Jensen, R., Simpson, L., Englund, P. 2008. What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. *Trends Parasitol.* **24 (10)**: 428-431.
- Kopperud, R., Krakstad, C., Selheim, F., Doskelans, S. 2003. cAMP effector mechanism. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett.* **546 (1)**:121-126.
- Lahman, S., Godfrey, D. 1970. Isolation of *Salivarian trypanosomes* from man and other animals using DEAE-cellulose. *Exp Parasitol.* **28**: 521-534.
- Lai, D., Hashimi, H., Lun Z., Ayala, F., Lukes, J. 2007. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *PANS.* **5 (6)**: 1999-2004.
- Laxman, S., Beavo, J. 2007. Cyclic Nucleotide signaling mechanism in Trypanosomes: possible targets for therapeutic agents. *Mol Interv.* **7 (4)**: 203-215.
- Lun, Z., Lai, D., Li, F., Lukes, J., Ayala, F. 2010. *Trypanosoma brucei*: two steps to spread out from Africa. *Trends Parasitol.* **26**: 424-427.
- Mahmoud, M., Gray, A. 1980. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi*, a review for recent research. *Trop Anim Hlth Prod.* **12**: 35-47.
- Mansini, P., Patton, C. 1981. Cyclic 3', 5'- adenosine monophosphate levels during the developmental cycle of *Trypanosoma brucei brucei* in the rat. *Mol Biol Chem Parasitol.* **3**: 19-31.
- Mathews, C., van Holde, K., Ahern, K. 2006. Bioquímica. Tercera edición, Pearson-Addison Wesley, Madrid, España.
- Naula, C., Seebeck, T. 2000. Cyclic AMP Signaling Trypanosomatids. *Parasitol Today.* **16 (1)**: 35-38.
- Nino, R. (Ed.), Aguilar, C. (Ed.), Dávila, I. (Ed.), Pacheco, M. (Ed.). 1996. Parasitología. Segunda edición, Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento de Parasitología, Valencia, Venezuela.

Parsons, M., Worthey, E., Ward, P., Mottram, J. 2005. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*. **6**: 127-146.

^a Potter, R., Taylor, S. 1979. Relationships between structural domains and function in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinases I and II from porcine skeletal muscle. *J Biol Chem*. **254 (7)**: 2413-2418.

^b Potter, R., Taylor, S. 1979. Correlation of the cAMP domain with a site of autophosphorylation on the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II from porcine skeletal muscle. *J Biol Chem*. **254 (18)**: 9000-9005.

Potter, R., Taylor, S. 1980. The structural domains of cAMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem*. **255 (20)**: 9706-9712.

Rascón, A., Soderling, S., Shaefer, J., Beavo, J. 2002. Cloning and characterization of cAMP-specific phosphodiesterase (TbPDE2B) from *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Sci USA*. **99(7)**: 4714-4719.

Ruiz, V., Guillén, M. 2005. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Editorial médica panamericana, Primera edición, Madrid, España.

Seebeck, T., Schaub, R., Johner. 2004. cAMP signaling in the kinetoplast protozoa. *Curr Mol Med*. **4**: 585-599.

Shalaby, T., Liniger, M., Seebeck, T. 2001. The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem*. **268**: 6197-6206.

Simano, K., Schafer, A., Wolkmer, P., Gonzalez, S., Miletti, L. 2010. Cryopreservation of *Trypanosoma evansi* after DEAE-cellulose purification: Evaluation of infective parameters. *Res Vet Sci*. **90**: 257-259.

Simpson, A., Stevens, J., Lukes, J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*. **22(4)**: 168-174.

Strickler, J., Patton, C. 1975. Adenosine 3', 5' -monophosphate in reproducing and differentiated trypanosomes. *Science*. **190 (4219)**: 1110-1112.

Su, Y., Dostmann, W., Herberg, F., Durick, K., Xuong, N., Ten, L., Taylor, S., Varughese, K. 1995. Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science*. **269**: 807- 813.

Taylor, S., Bubis, J., Toner-Webb, J., Saraswat, L., First, E., Buechler, J., Knighton, D., Sowadski, J. 1988. cAMP-dependent protein kinase: prototype for a family of enzymes. *FASEB J*. **2**: 2677-2685.

Taylor, S., Kim, C., Cheng, C., Brown, S., Wu, J., Kannan, N. 2008. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochem Biophys Acta*. **1784 (1)**: 16-26.

The QIAexpressionisttm. 2003. 5^{ta} edición. QIAGEN.

Vanhollebeke, B., Truc, P., Poelvoorde, M., Pays, A., Joshi, P., Katti, R., Pays, E. 2006. Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack apolipoprotein L-I. *N Engl J Med*. **355 (26)**: 2752-2756.

Consultas en línea:

<http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/ganaderia/equinos/enfermedades/tripanosomosis.htm>

[Consulta: 22 de Noviembre de 2011]

<http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/womack/index.php> [Consulta: 22 de Noviembre de 2011]