



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**“Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de
proteínas no nucleares en *Trypanosoma cruzi*”**



Presentada por Victoria Lucía Alonso

Rosario, Argentina

2014

“Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de proteínas no nucleares en *Trypanosoma cruzi*”

Victoria Lucía Alonso

Licenciada en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología y Bioquímica de *Trypanosoma cruzi* del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET) y de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01 de abril de 2010 y el 12 de diciembre de 2014, bajo la dirección del Dr. Esteban C. Serra.

*“Hermoso es lo que vemos.
Más hermoso es lo que sabemos.
Pero mucho más hermoso es lo que no conocemos”*

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado y el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Tiene un ciclo de vida complejo que alterna entre dos huéspedes y por lo menos tres estadios de desarrollo diferentes. Este parásito presenta características únicas que lo hacen un interesante modelo para el estudio de diversas problemáticas de las células eucariotas.

El bromodominio es un dominio proteico de unión a lisinas acetiladas, descrito originariamente en proteínas de unión a histonas acetiladas. Este dominio evolutivamente conservado se encuentra comúnmente en proteínas nucleares que cumplen funciones relacionadas con la regulación de la estructura de la cromatina y la activación transcripcional. La capacidad única del bromodominio de reconocer lisinas acetiladas se relaciona con un nuevo mecanismo de regulación de las interacciones proteína-proteína vía acetilación de lisinas, el cual tiene amplias consecuencias en variados procesos celulares. En el genoma de *Trypanosoma cruzi* están presentes seis secuencias codificantes para proteínas con bromodominios. Nos propusimos caracterizar una de ellas, denominada Factor con Bromodominio 3 (*TcBDF3*), y evaluar su expresión en el parásito, su localización subcelular, su capacidad de interactuar con sustratos acetilados y su rol en la biología de los tripanosomas.

TcBDF3 se expresa en todos los estadios del ciclo de vida, presentando una localización atípica. En epimastigotes y amastigotes se encuentra en el citoplasma, flagelo y bolsillo flagelar mientras que en tripomastigotes solo en el flagelo. Pudimos determinar que este bromodominio es capaz de interactuar con la α -tubulina acetilada presente en el citoesqueleto y flagelo de *T. cruzi*. Además, esta unión parece ser específica ya que no es capaz de reconocer histonas acetiladas. La sobre-expresión de una versión truncada de *TcBDF3* hace que se pierda la localización flagelar y disminuye la capacidad de los epimastigotes de diferenciarse a tripomastigotes, proceso denominado metacicloogénesis. Al sobre-expresarse de manera inducible una versión salvaje y una doble mutante puntual de *TcBDF3* observamos nuevamente una disminución en la tasa de metacicloogénesis y efectos en las tasas de infección *in vitro* (esta doble mutante no posee la capacidad de unir α -tubulina acetilada). Estos resultados sugieren que este bromodominio es esencial para *Trypanosoma cruzi* y jugaría un papel importante en el proceso de diferenciación e infección.

Finalmente, ensayamos distintos inhibidores de bromodominios comerciales sobre epimastigotes de *T. cruzi* y determinamos la capacidad de uno de ellos de unirse a *TcBDF3* recombinante.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis nos permiten proponer que *TcBDF3* es esencial para el crecimiento y diferenciación de *T. cruzi* y que podría ser un blanco interesante para el desarrollo de nuevas drogas tripanosidas. Por otro lado, se abren nuevos interrogantes sobre el rol de la acetilación en la dinámica del citoesqueleto y como los bromodominios pueden participar en diversos mecanismos de regulación tanto dentro como fuera del núcleo.

Los resultados obtenidos durante este trabajo fueron publicados y presentados en las siguientes revistas y reuniones científicas:

Publicaciones

“Construction of three new Gateway® expression plasmids for *Trypanosoma cruzi*” **Alonso VL** and Ritagliati C, Cribb P, Serra EC. Technical note. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2014. doi: 10.1590/0074-0276140238 .

“*Trypanosoma cruzi* Bromodomain Factor 3 (TcBDF3) binds acetylated α tubulin and concentrates in the flagellum during metacyclogenesis” **Alonso VL**, Villanova GV, Ritagliati C, Machado Motta MC, Cribb P, Serra EC. Research article. Eukaryotic Cell. 2014 Jun;13(6):822-31. doi: 10.1128/EC.00341-13.

“Lysine acetylation: elucidating the components of an emerging global signaling pathway in Trypanosomes” **Alonso VL** and Serra EC. Review article. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:452934. doi: 10.1155/2012/452934.

Congresos y reuniones científicas

X Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, Sociedad Argentina de Protozoología (SAP), 2014. “Testing Bromodomain inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: discovery of new druggable targets”. **Alonso VL**, Manarin R, Cricco JA, Serra EC. **Poster**. Mar del Plata, Argentina.

L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 2014. “Bromodomain Factor 3 is essential for *Trypanosoma cruzi* growth and differentiation”. **Alonso VL**, Ritagliati C, Motta MC, Cribb P, Serra EC. **Comunicación oral**. Rosario, Argentina.

XXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, 2013. “Conversión del vector de *Trypanosoma cruzi* pTcINDEX al sistema de clonado por recombinación Gateway”. **Alonso VL**, Ritagliati C, Cribb P, Serra EC. **Poster**. Rosario, Argentina.

XXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, 2013. “El doble mutante puntual del bromodominio 3 de *Trypanosoma cruzi* (TcBDF3) se comporta como un mutante dominante negativo”. **Alonso VL**, Cribb P, Serra EC. **Poster**. Rosario, Argentina.

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 2012. “*Trypanosoma cruzi* BDF3 binds acetylated α -tubulin and migrates to the flagellum during metacyclogenesis”. **Alonso VL**, Villanova GV, Ritagliati C, Motta MC, Cribb P, Serra EC. **Comunicación Oral**. Mendoza, Argentina.

XXV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, Jornada Científica por el 50° Aniversario del Programa Nacional de Chagas e Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén”, 2012. “La sobre expresión de una versión truncada de la proteína con bromodominio TcBDF3 afecta el crecimiento y la metacicloogénesis en *Trypanosoma cruzi*”. **Alonso VL**, Ritagliati C, Cribb P, Serra EC. **Poster**. Buenos Aires, Argentina.

IX Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, Sociedad Argentina de Protozoología (SAP), 2011 “*Trypanosoma cruzi* Bromodomain Factor 3 binds cytoskeletal and flagellar acetylated alfa tubulin”. **Alonso VL**, Ritagliati C, Villanova GV, Cribb P, Serra E. **Poster**. Mar del Plata, Argentina.

XXIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, 2010. “Desacetilasas citoplasmáticas en *Trypanosoma cruzi*”. **Alonso VL**, Ritagliati C, Villanova GV, Serra E. **Poster**. Ascochinga, Córdoba, Argentina.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ÍNDICE	IV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VIII
LENGUAJE ESPECIAL	X
I INTRODUCCIÓN	1
I.1 ORIGEN, EVOLUCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	1
I.1.1 ORIGEN EVOLUTIVO	1
I.1.2 DIVERSIDAD GENÉTICA	4
I.1.3 EVOLUCIÓN GENÓMICA	4
I.1.4 DESCUBRIMIENTO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	6
I.1.5 ENFERMEDAD DE CHAGAS	7
I.2 BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	9
I.2.1 CICLO DE VIDA	9
I.2.2 MORFOLOGÍA DE LOS ESTADIOS DEL CICLO DE VIDA	13
I.2.3 EL NÚCLEO Y LA ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA	15
I.2.4 ORGANELAS PARTICULARES	20
I.2.5 LA SUPERFICIE CELULAR Y EL CITOESQUELETO	21
I.3 ACETILACIÓN DE PROTEÍNAS	26
I.3.1 ACETILACIÓN COMO MECANISMO GLOBAL DE REGULACIÓN	26
I.3.2 ACETILTRANSFERASAS Y DESACETILASAS	29
I.3.3 ACETILACIÓN Y DINÁMICA DEL CITOESQUELETO	32
I.4 BROMODOMINIOS	35
I.4.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN	36
I.4.2 RECONOCIMIENTO DE LA ACETIL-LISINA	38
I.4.3 FUNCIONES REPORTADAS PARA BROMODOMINIOS	40
I.4.4 INHIBIDORES DE BROMODOMINIOS	41
I.4.5 ROL DE LOS BROMODOMINIOS EN LA ENFERMEDAD	44
II OBJETIVOS	47

III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
III.1	EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TcBDF₃ EN TRYPANOSOMA CRUZI	48
III.1.1	ANÁLISIS DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE TcBDF ₃	48
III.1.2	EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-TcBDF ₃	51
III.1.3	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TcBDF ₃ EN EPIMASTIGOTES	52
III.1.4	LOCALIZACIÓN DE TcBDF ₃ DURANTE EL CICLO DE VIDA	55
III.1.5	LOCALIZACIÓN DE TcBDF ₃ Y α -TUBULINA ACETILADA DURANTE LA METACICLOGÉNESIS	57
III.1.6	CO-LOCALIZACIÓN DE TcBDF ₃ Y α -TUBULINA ACETILADA EN CITOESQUELETOS Y FLAGELOS AISLADOS	59
III.1.7	ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE TcBDF ₃ Y α -TUBULINA ACETILADA <i>IN VIVO</i>	60
III.1.8	ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE TcBDF ₃ Y α -TUBULINA ACETILADA <i>IN VITRO</i>	63
III.1.9	ESTADO MULTIMÉRICO DE TcBDF ₃ <i>IN VITRO</i>	64
III.1.10	DISCUSIÓN GENERAL	65
III.2	ANÁLISIS FUNCIONAL DE TcBDF₃ EN TRYPANOSOMA CRUZI	68
III.2.1	SOBRE-EXPRESIÓN DE UNA VERSIÓN TRUNCADA DE TcBDF ₃	68
III.2.2	DISEÑO DE MUTANTES PUNTUALES DE TcBDF ₃	71
III.2.3	CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PTCINDEX-GW	72
III.2.4	SOBRE-EXPRESIÓN DE VERSIONES MUTANTES DE TcBDF ₃ EN EPIMASTIGOTES	75
III.2.5	EXPRESIÓN DE BDF ₃ - Y103A/L110A RECOMBINANTE PARA ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	77
III.2.6	SOBRE-EXPRESIÓN DE VERSIONES MUTANTES DE TcBDF ₃ EN INFECCIONES <i>IN VITRO</i>	79
III.2.7	DISCUSIÓN GENERAL	81
III.3	EVALUACIÓN DE INHIBIDORES DE BROMODOMINIOS SOBRE TRYPANOSOMA CRUZI	83
III.3.1	INTERACCIÓN DE TcBDF ₃ CON EL INHIBIDOR IBET-151	83
III.3.2	EFECTO DE IBET-151 SOBRE TRYPANOSOMA CRUZI	89
III.3.3	EFECTO DE OTROS INHIBIDORES DE BROMODOMINIOS SOBRE T. CRUZI	91
III.3.4	DISCUSIÓN GENERAL	93
IV	CONCLUSIONES	96
V	MATERIALES Y MÉTODOS	99
V.1	HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	99
V.1.1	BASES DE DATOS	99
V.1.2	ANÁLISIS DE SECUENCIAS	99
V.2	MEDIOS DE CULTIVOS Y CEPAS	99
V.2.1	MEDIOS Y CEPAS BACTERIANAS	99
V.2.2	MEDIOS Y CEPAS DE TRYPANOSOMA CRUZI	101

V.3	TÉCNICAS DE CULTIVO DE <i>T. CRUZI</i>	102
V.3.1	INFECCIONES <i>IN VITRO</i>	102
V.3.2	OBTENCIÓN DE AMASTIGOTES	102
V.3.3	OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES	103
V.3.4	OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES METACÍCLICOS (<i>METACICLOGÉNESIS IN VITRO</i>)	103
V.3.5	TINCIÓN CON COLORANTE GIEMSA	104
V.3.6	CONTAJE DE CÉLULAS	104
V.4	TÉCNICAS PARA EL TRABAJO CON PROTEÍNAS	104
V.4.1	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN <i>E. COLI</i>	104
V.4.2	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD	105
V.4.3	COLUMNA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR POR FPLC	106
V.4.4	OBTENCIÓN DE ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR, UV-VISIBLE Y DE FLUORESCENCIA	106
V.4.5	INMUNIZACIÓN DE RATONES Y CONEJOS PARA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS	106
V.4.6	PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TcBDF ₃	106
V.4.7	EXTRACTOS PROTEICOS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	107
V.4.8	SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	109
V.4.9	TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA CON PLATA	109
V.4.10	ELECTRO-ELUCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE GELES DE ACRILAMIDA	110
V.4.11	WESTERN BLOT	110
V.4.12	FAR WESTERN BLOT Y SLOT BLOT	110
V.4.13	CO-INMUNOPRECIPITACIÓN	110
V.4.14	INMUNOCITOLocalización	111
V.4.15	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	111
V.5	TÉCNICAS PARA EL TRABAJO CON ÁCIDOS NUCLEICOS	112
V.5.1	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	112
V.5.2	MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA TIPO ZOE-PCR	113
V.5.3	DIGESTIÓN DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	114
V.5.4	ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	114
V.5.5	PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	115
V.5.6	PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	115
V.5.7	SECUENCIACIÓN DE ADN	115
V.5.8	PURIFICACIÓN DE ADN TOTAL DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	115
V.5.9	CLONADO EN VECTORES TIPO T	115
V.5.10	CLONADO POR DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN	116

V.5.11	CLONADO POR RECOMBINACIÓN	116
V.5.12	PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE <i>E. COLI</i>	116
V.5.13	TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN	116
V.5.14	TRANSFECCIÓN DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	117
VI	BIBLIOGRAFÍA	119
	AGRADECIMIENTOS	134
	NOTAS	135

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AA	Aminoácido
Ac	Acetilada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNP	ADN Polimerasa
ADP	Adenosina di fosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARN-SL	ARN-secuencia líder
ARNg	ARN guía
ARNm	ARN mensajero
ARNP	ARN polimerasa
ARNpn	ARN pequeño nuclear
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosina tri-fosfato
BSA	Albumina sérica bovina
BLAST	Basic Local Alignment and Search Tool
BRD	Bromodominio
C-terminal	Carboxilo terminal
csp	Cantidad suficiente para
CDS	Secuencia codificantes
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
dNTP	2'-desoxinucleósido 5'-trifosfato
DO	Densidad óptica
DSP	Di-tio-bis-succinimidilpropionato
DTT	Ditiotreitol
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GFP	Proteína verde fluorescente
GPI	Glucosilfosfatidil inositol
GST	Glutación S-transferasa
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona desacetilasa

IPTG	Isopropil-D-tiogalactósido
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
KAT	Lisina acetiltransferasa
KDAC	Lisina desacetilasa
LB	Luria Bertani
LIT	Infusión hígado-triptosa
MPT	Modificación post-traducciona
N-terminal	Amino terminal
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro VII
poli-A	tracto de Adeninas
PPi	Poli fosfatos
RMN	Resonancia magnética nuclear
SIRT	Sirtuinas
ssp.	especies
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Tet	Tetraciclina
VSG	Glicoproteína variante de superficie
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indoil-D-galactósido
SDS	Dodecilsulfato sódico
PAGE	Poliacrilamide gel electroforesis

LENGUAJE ESPECIAL

Loop: bucle, conecta elementos de estructura secundaria.

Imprinting: Impronta genética.

Cross-linking: entrecruzamiento, formación de enlaces covalentes entre moléculas.

Knockout: anulación.

Trans-splicing: corte y empalme entre dos moléculas.

Quenching: atenuación de la fluorescencia.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Western blot: inmunodetección de proteínas separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

Far-western blot: inmunodetección de proteínas que interaccionan con proteínas separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

En cada capítulo se indican las abreviaturas y los términos en lenguaje especial utilizados.

INTRODUCCIÓN



I INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado y el agente causal de la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es una zoonosis compleja transmitida por insectos hematófagos y existen más de 70 especies de mamíferos susceptibles a la infección. La presencia de *T. cruzi* se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta la Patagonia Argentina y la enfermedad de Chagas se considera la infección parasitaria más importante en América Latina con serias consecuencias para la salud pública y para las economías nacionales. En el capítulo 1 y 2 de la introducción se describirán las características principales de este parásito y de la enfermedad que causa.

I.1 ORIGEN, EVOLUCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Los Kinetoplástidos son un grupo singular de protistas que está compuesto por diversas especies de vida libre o parásitos patógenos de invertebrados, vertebrados y plantas. El género *Trypanosoma* es el responsable de diversas enfermedades como la Enfermedad del Sueño, el Mal de Chagas y la Leishmaniasis. Estos organismos unicelulares, que aparentan ser simples, son expertos en encontrar soluciones no ortodoxas a la problemática de ser células eucariotas.

I.1.1 ORIGEN EVOLUTIVO

Los parásitos hemoflagelados de humanos y animales domésticos, como *Trypanosoma cruzi*, *brucei* y *Leishmania* ssp. están entre los agentes causales de enfermedades parasitarias mejor estudiados. En consecuencia, se ha especulado e investigado desde hace mucho tiempo sobre su historia evolutiva. Un ejemplo peculiar es la descripción de microorganismos flagelados en el Diccionario Enciclopédico “Brockhaus y Efron” publicado en la Rusia Imperial entre 1890 y 1907. En la figura 1 se observa una de las ilustraciones de esta publicación donde se representan distintos organismos flagelados.

El orden Kinetoplastida incluye un grupo de protozoos definido por la presencia de una organela característica, el kinetoplasto que es una porción modificada de una única gran mitocondria. Tradicionalmente, la taxonomía de los kinetoplástidos se ha basado en las características morfológicas y ciclo de vida de estos protozoos, dividiendo a este orden en dos subórdenes: Bodonidae y Trypanosomatidae. Los bodonidos son de vida libre o parásitos (ectoparásitos de peces, endoparásitos de peces y caracoles). El otro subgrupo, los tripanosomátidos, incluyen a parásitos obligados de importancia médica y veterinaria que infectan distintas clases de vertebrados, algunos invertebrados y plantas.

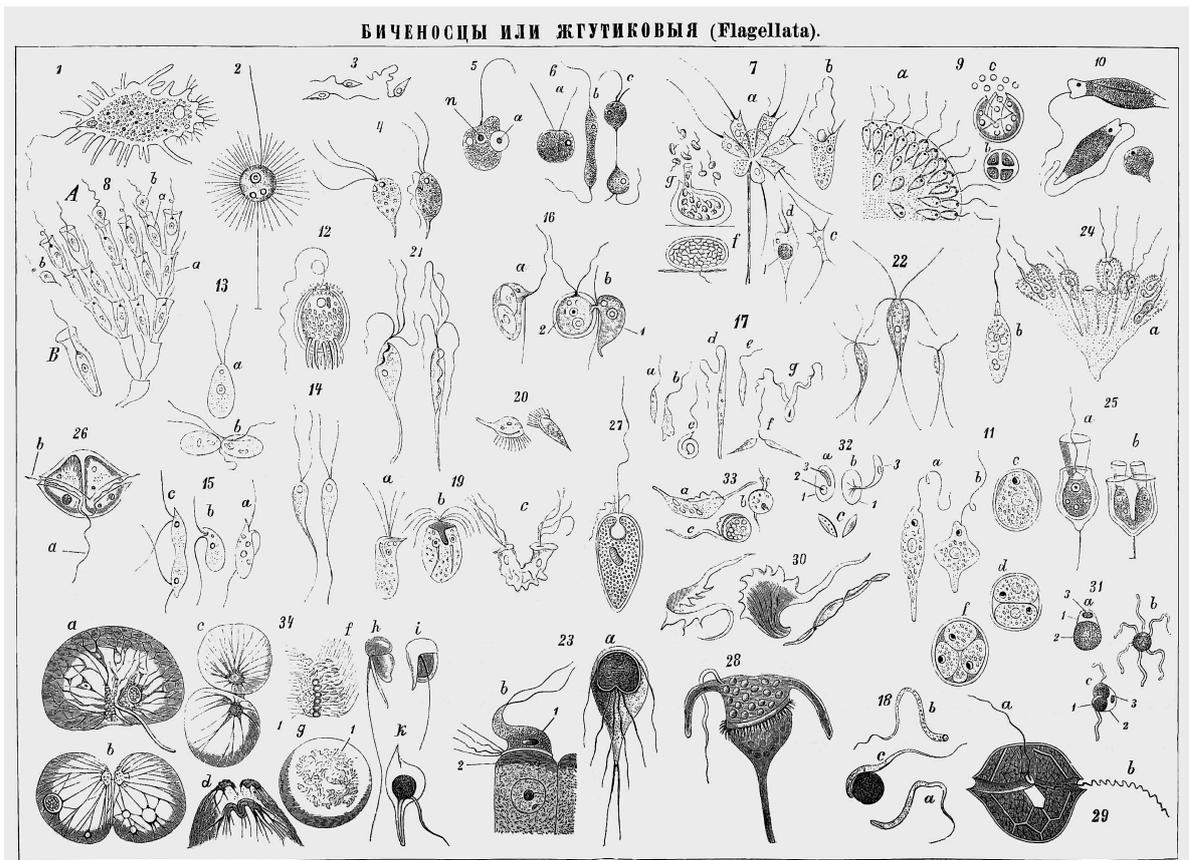


Figura 1: Lamina del Diccionario Enciclopédico Ruso de Brockhaus y Efron (1890-1907) donde se representan distintos organismos flagelados.

En los últimos años, nueva evidencia molecular de diversos orígenes ha determinado que esta división del orden Kinetoplastida es artificial. Actualmente, esta clase se divide en dos subclases, Prokinetoplastina (incluye especies del género *Ichthyobodo* y *Perkinsiella*) y Metakinetoplastina (incluye otros bodonidos y tripanosomátidos). Dentro de la subclase Metakinetoplastina, que cuenta con el mayor número de integrantes, se encuentra el orden Trypanosomatida y tres nuevos órdenes: Eubodonida, Parabodonida, Neobodonida, que corresponden a los clados de bodonidos más importantes (Moreira et al., 2004) (Figura 2).

Recientemente, se observó que el orden Trypanosomatida surgió a partir de un grupo más grande de tripanosomátidos, que son parásitos de insectos (algunos de los cuales tienen huéspedes vertebrados y/o plantas) y a partir de resultados obtenidos analizando distintos marcadores moleculares se determinó que tienen un origen monofilético. Es decir, que descendieron de un ancestro común y que el orden contiene a todos los descendientes conocidos de ese ancestro.

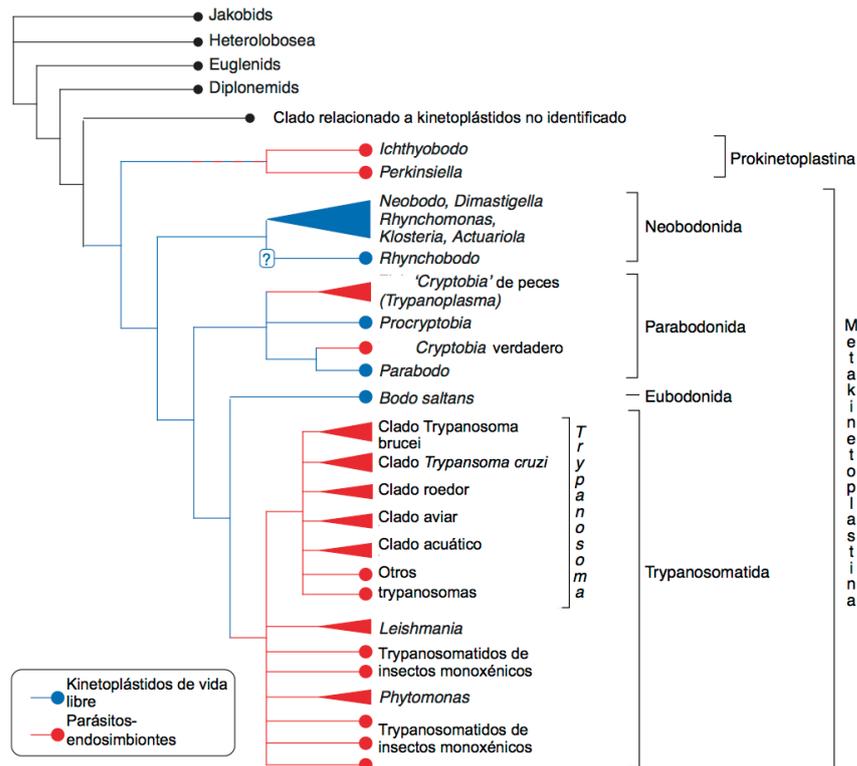
Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de proteínas no nucleares en *Trypanosoma cruzi*

Figura 2: Relación evolutiva entre kinetoplastos basado en árboles filogenéticos del ARN ribosomal de la subunidad 16S y 18S y filogenias de proteínas. Las líneas negras representan ramas fuera del grupo kinetoplastos. Los círculos indican que el clado tiene un solo o pocos representantes, los triángulos corresponden a clados con varios representantes. Adaptado de Simpson et al, 2006.

En cuanto al origen de los tripanosomátidos, parece ser que se dispersaron radialmente e infectaron distintas clases de vertebrados, transmitidos por una gran variedad de vectores hematófagos. En conclusión, la evidencia sugiere que el “tripanosomátido ancestral” fue un parásito de insectos y uno de estos linajes tempranos, tal vez, un parásito de insectos hematófagos, se adaptó y se volvió dependiente de un huésped vertebrado. Este cambio de huésped podría haber sido un evento terrestre asumiendo que, al igual que los insectos hematófagos modernos, los insectos antiguos se alimentaban de sangre de vertebrados terrestres. No hay fechas confiables del origen de los insectos hematófagos, aparentemente aparecieron 370 millones de años atrás, luego de la aparición de los primeros vertebrados terrestres. Entonces, un factor clave en la evolución radial de los tripanosomátidos, parece ser la transmisión entre vertebrados que compartían ambientes.

La mayoría de las especies de *Trypanosoma* que se estudiaron usando métodos moleculares se dividen en pequeños clados que se correlacionan con factores como: taxón del huésped, ecología y especialmente, taxón del vector (Figura 2). Está claro que *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania major*, los cuales tienen sus respectivos genomas secuenciados, están relacionados distantemente y tienen historias evolutivas distintas. Es muy importante

considerar este último punto a la hora de extrapolar conclusiones de uno de estos organismos a otro (Revisado por Stevens, 2008 y Simpson et al., 2006).

I.1.2 DIVERSIDAD GENÉTICA

La variabilidad del genoma de *T. cruzi* y la diversidad de genotipos y fenotipos de esta especie ha sido ampliamente descrita a través de los años y se han definido distintos subgrupos siguiendo criterios ecológicos y epidemiológicos. Actualmente, la especie *T. cruzi* se clasifica en seis unidades de tipificación discreta (DTUs del inglés “Discrete Typing Units”) (Brisse et al., 2000). En 2009, estas DTUs fueron renombradas como TcI-TcIV (Zingales et al., 2009). *Trypanosoma cruzi* es básicamente una población clonal, refiriéndose el término clonal en este contexto a la estructura de la población y no a su sistema de propagación. Esto no quiere decir que la recombinación y el intercambio genético estén totalmente ausente en las poblaciones de este parásito, pero es un mecanismo raro que no rompe con el patrón prevalente de clonalidad. Se ha reportado que existen eventos de recombinación genética entre DTUs de *T. cruzi* y se ha observado experimentalmente el intercambio de material genético mediante mecanismos aún desconocidos. Pero la especie considerada como un todo, presenta todas las características de una estructura poblacional clonal. Dado que *T. cruzi* es predominantemente diploide y su mecanismo de replicación es la fisión binaria (proceso asexual), las nuevas DTUs evolucionan por acumulación de mutaciones discretas que no son afectadas por eventos raros de intercambio genético. Sin embargo, existe evidencia de heterocigosidad en este parásito, la cual se descubrió al estudiar genes aislados y se vio que es muy pronunciada en aislamientos naturales de las unidades TcV y TcVI, lo que sugiere que estas DTUs son híbridas derivadas de TcII y TcIII. El resto de las DTUs muestra una homocigosidad alélica sustancial (Revisado por Zingales et al., 2012).

I.1.3 EVOLUCIÓN GENÓMICA

Desde la publicación de las secuencias genómicas de los “TriTryps” (*T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania major*) en 2005 (Berriman et al., 2005, El-Sayed et al., 2005, Ivans et al., 2005) se han realizado diversos análisis comparativos de las mismas. Además, se han complementado con análisis transcriptómicos y proteómicos de la expresión génica en los distintos estadios de los ciclos de vida. Luego de diez años de análisis comparativo y experimental de estos genomas, se pueden distinguir características particulares que probablemente hayan sido muy importantes para la evolución del parasitismo. Por ejemplo, es intuitivo pensar que la reducción fenotípica observada en los parásitos se vea reflejada en una reducción genómica. Este no es el caso de los TriTryps, ya que el tamaño de sus genomas (25-37 Mb en su estado haploide) y su densidad génica (2,8-4,6 Kb/gen) es

comparable con el de eucariotas unicelulares de vida libre. Se sabe desde hace mucho tiempo que los tripanosomátidos carecen de determinadas vías metabólicas, por ejemplo, son auxótrofos para pteridina y folato, no presentan biosíntesis de hemo (lo toman de su hospedador), son auxótrofos para purinas y también carecen de un sistema redox de homeostasis basado en catalasa y glutatión reductasa. Pese a estas carencias, son capaces de emplear soluciones únicas que les permiten tener una fisiología eucariota típica. No está claro si estos genes se perdieron o nunca existieron aunque hay evidencia de que los genomas de estos organismos se han expandido durante su evolución (Revisado por Jackson, 2014).

En cuanto a las peculiaridades encontradas en los genomas de tripanosomátidos cabe destacar:

- Familias de genes especie-específicas: Las superficies de estos organismos poseen varias proteínas polimórficas combinadas con diversos conjugados glicolipídicos que no están presentes en otros organismos y son diferentes entre los TriTryps. Además, la distribución de estas familias génicas en el genoma no es al azar y están implicadas en la virulencia y mecanismo de patogénesis.
- Zonas de contingencia: Los tripanosomátidos presentan sub-dominios genómicos que en general se ubican hacia los telómeros.
- Proteasas de superficie especie específica: la familia de genes MSP (del inglés “Major Surface Protease”) son metaloproteasas involucradas en la patogenicidad y virulencia. Debido a su presencia en todos los tripanosomátidos podemos inferir que las MSP fueron importantes para la adaptación al parasitismo.

Los tripanosomátidos presentan diversos estadios morfológicamente diferentes y la transición entre ellos coincide con el paso por diferentes ambientes, ya sea distintos huéspedes o distintas células. En varias especies se ha estimado la proporción de genes expresados diferencialmente entre los distintos estadios, pero solo una minoría significativa es regulada durante el ciclo de vida. Es probable que esta regulación sea a nivel de ARNm, ARNs no codificantes y a través de la interacción con proteínas de unión al ADN y ARN.

En cuanto a los mecanismos moleculares de la evolución genómica en tripanosomátidos, podemos nombrar:

- Duplicación génica: estos eventos varían en tamaño, yendo desde sustituciones de aminoácidos únicos hasta duplicaciones cromosomales. Un ejemplo claro de la importancia de los mecanismos de duplicación es la abundancia de arreglos génicos en tándem presentes en estos organismos. Lo que, en algunos casos, se ha

asociado a un aumento de la abundancia de transcritos para genes altamente expresados. Además, los duplicados en tándem pueden evolucionar y adquirir nuevas funciones.

- Transferencia horizontal de genes: se han identificados 49 eventos putativos de este tipo provenientes de bacterias y otros eucariotas. Un ejemplo particular es la vía de biosíntesis de hemo que se encuentra ausente en *T. cruzi* pero parcialmente restaurada en *Leishmania* ssp. a través de la transferencia horizontal de tres genes provenientes de γ proteobacterias.

Para concluir, el contenido genético de los genomas de tripanosomátidos indica que estos se han expandido tanto en su estructura física como en su capacidad fisiológica. Los genes específicos de cada especie tienen un rol central en el ciclo de vida y en el proceso de enfermedad particular de cada uno, remarcando que en muchos casos no es correcto extrapolar conclusiones de una especie a otra (Daniels et al., 2010, Souza et al., 2011, Martínez-Calvillo et al., 2010).

1.1.4 DESCUBRIMIENTO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

En 1907 el Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz encargó una campaña anti-palúdica en la región norte del Estado de Minas Gerais (Brasil) donde se estaba construyendo la “Estrada do Ferra Central do Brasil”, uno de los principales ferrocarriles de ese país. En esta campaña participó el Dr. Carlos Chagas, que trabajaba en el Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro. Durante la misma, el Dr. Chagas se entera la existencia de insectos hematófagos que habitaban en los domicilios y a partir de el estudio de los mismo logra identificar a *Trypanosoma cruzi*. También propone que este nuevo parásito es el responsable de la alta tasa de morbilidad difusa que reinaba en la región y que hasta el momento había sido relacionada con distintos orígenes, como la deficiencia crónica de Iodo. Su trabajo titulado “Nova tripanozomíaze humana” fue publicado en 1909 en la revista Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. En este trabajo detalla que estos insectos eran denominados por los habitantes de la zona “barbeiros” y se escondían en las grietas y techos de paja de casas precarias durante el día y se alimentaban de noche, picando a los humanos que las habitaban. Además, explica que al examinar el contenido intestinal de los insectos, se encuentra con la presencia de organismos flagelados con las características morfológicas de las *Crithidias*. Luego, describe que estos flagelados son capaces de infectar diversos animales de laboratorio y detalla el ciclo completo de este nuevo protozoo, al que denomina *Schizotrypanum cruzi*. En este trabajo también examina la sangre de las personas y los animales que habitaban donde se encontraron “barbeiros” descubriendo en todos ellos la presencias de tripanosomátidos. Finalmente, Carlos Chagas logra describir síntomas

frecuentes asociados a la presencia de *T. cruzi* y analiza detalladamente la historia clínica de varios pacientes con síntomas agudos (Chagas, 1909).

El trabajo del Dr. Chagas sorprende por su cantidad de detalle y por las conclusiones que logra obtener, pese a las limitaciones de la época. Además, logra recrear el ciclo completo de *T. cruzi* y evalúa la virulencia de estos parásitos en animales de laboratorio. Las laminas dibujadas por él que se incluyen en su trabajo son increíblemente detalladas, en la figura 3 se observan dos de estas laminas donde representa todas las formas encontradas en sangre de humanos y animales infectados y dentro de los insectos.



Figura 3: Lamina 10 y 11 del trabajo original de Carlos Chagas de 1909 dibujados por él mismo. En la lámina de la izquierda se observan los estadios encontrados en la sangre de humanos y animales infectados. En la lámina de la derecha se observan las formas encontradas en el insecto hematófago. En cada dibujo se detalla núcleo y kinetoplasto en rojo. Adaptado de Chagas, 1909.

I.1.5 ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas es una zoonosis muy compleja que está presente en casi todo el territorio americano, desde Estados Unidos hasta el sur de Argentina y continúa representando una grave amenaza para los habitantes de los países de la región. Los mecanismos de transmisión pueden ser vectorial y por transfusiones sanguíneas. Además existe la transmisión congénita y la infección oral por ingestión de comida o bebida

contaminada. Debido a las campañas de desinfección y al control en los bancos de sangre, en los primeros años del siglo XXI, estas últimas formas de transmisión se han vuelto mucho más importantes. Alrededor de un 30% de las personas infectadas presenta problemas cardiovasculares, gastrointestinales y/o neurológicos irreversibles. La Enfermedad de Chagas afecta alrededor de 8 millones de personas en 21 países de América Latina pero debido al aumento de las migraciones, actualmente se esta diseminando hacia regiones no-endémicas. Además, es considerada la enfermedad parasitaria con mayor impacto económico en América Latina debido a su prolongada cronicidad y su asociación directa con la pobreza, ya que la presencia del insecto vector esta asociada a condiciones de vivienda precarias (WHO, 2012). La persona infectada desarrolla la enfermedad en diferentes fases, entre estas se distinguen la fase aguda y la crónica. Un porcentaje bajo de infectados muestran síntomas en la fase aguda, generalmente los niños, como el chagoma de inoculación (edema periocular), fiebre, hepatoesplenomegalia, entre otros. Estos síntomas, excepto el chagoma de inoculación (conocido como síndrome de Romania), son inespecíficos y no pueden asociarse fácilmente a la infección. La forma crónica, que aparece después de diez o más años luego de la primo-infección, se caracteriza por cardiopatías que pueden provocar desde una fuerte discapacidad cardíaca hasta muerte súbita, y trastornos digestivos como megaesófago y megacolon (Atias, 2006).

Existen una gran variedad de cepas de *T. cruzi* que infectan unas 150 especies de 24 familias de animales domésticos y silvestres, además del hombre. Como se mencionó anteriormente, *Trypanosoma cruzi* se clasifica en DTUs que tienen distinta distribución geográfica así como las distintas especies de vectores (Figura 4). No se conoce aún el rol que las distintas especies de vectores tienen como filtros biológicos de la transmisión de distintas DTUs. Actualmente, la estrategia de control de la enfermedad está basada en la interrupción de la transmisión vectorial y en el tamizado sistemático de sangre de dadores en todos los países endémicos; así como en la detección y tratamiento de la transmisión congénita y en la administración de tratamiento en casos agudos y niños. Estas intervenciones han contribuido a la interrupción de la transmisión en amplias regiones del continente. Brasil, Chile y Uruguay fueron declarados países libres de transmisión por *Triatoma infestans* con la consecuente disminución en la incidencia de casos en humanos (Ministerio de Salud de la Nación, 2012). En la Argentina, la transmisión por este vector ha sido interrumpida en varias provincias, pero las condiciones geográficas y climáticas del Gran Chaco (región que incluye las provincias del Chaco, Formosa y parte de Santiago del Estero) hace prácticamente imposible la erradicación del vector en esta zona.

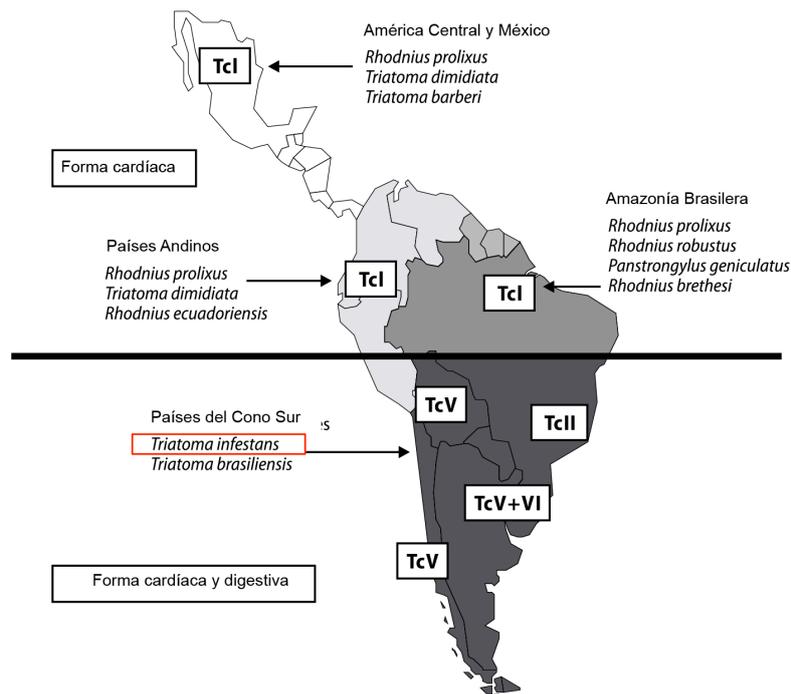
Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de proteínas no nucleares en *Trypanosoma cruzi*

Figura 4: Distribución geográfica de las unidades discretas de tipificación (DTUs) en las que se clasifica *T. cruzi* (TcI-TcVI). Se indican también los vectores Triatominae de mayor importancia epidemiológica y se recuadra en rojo a *T. infestans*, presente en Argentina. Países andinos: Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela; Países del cono sur: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Uruguay y Paraguay. La línea separa los tipos de manifestaciones clínicas prevalentes en cada región. Adaptado de: Reporte Técnico sobre Enfermedad de Chagas, Tripanosomiasis Americana y Leishmaniasis, Organización Mundial de la Salud, 2012.

En la actualidad no existe una vacuna contra *T. cruzi*, y los únicos dos medicamentos disponibles se encuentran en el mercado desde hace más de 40 años (Benznidazol y Nifurtimox). Estas drogas son efectivas en recién nacidos, pacientes en etapa aguda y presentan en general buena respuesta en niños pero su efectividad en la etapa crónica es controvertida y actualmente se encuentra en estudio. Su desventaja es que requieren tratamientos prolongados con efectos secundarios frecuentes que en muchos casos llevan a su interrupción. Un reporte reciente de la Organización Mundial de la Salud indica que es prioritario enfocar las investigaciones en la producción de nuevas drogas con tiempos de tratamiento más cortos, menos efectos secundarios y al diseño de formulaciones pediátricas.

I.2 BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

I.2.1 CICLO DE VIDA

Como se mencionó, el ciclo de vida de *T. cruzi* fue elucidado hace más de un siglo por el médico brasileño Carlos Chagas. Este parásito puede encontrarse en dos tipos de hospedadores, un hospedador vertebrado (humanos, mamíferos salvajes tales como

marsupiales o armadillos y animales domésticos) y uno invertebrado (triatominos) (Figura 5). Los hospedadores invertebrados pertenecen a las familias Hemiptera y Reduviidae de las que se han descrito aproximadamente 100 especies existentes solamente en el continente americano, de las cuales la mayoría son importantes para el ciclo selvático de la enfermedad de Chagas. Solo algunas especies infestan el hábitat humano y son importantes para la transmisión de la enfermedad, entre ellos, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans* (conocido en nuestro país como “vinchuca”) son los mejor caracterizados.

El desarrollo de estos insectos está compuesto por cinco estadios larvales y un estadio adulto, y todos son hematófagos (pueden ingerir un volumen de sangre de entre 6 y 12 veces su volumen corporal). La sangre ingerida se almacena casi sin digerir en una parte ancha del intestino medio, llamado estómago o buche. Los anticoagulantes presentes en las glándulas salivales y en el estómago previenen que la sangre se coagule (Lange et al., 1999). Durante la ingesta de sangre se liberan hormonas diuréticas y se transporta agua e iones a través de la pared del estómago y la hemolinfa hacia los túbulos de Malpighi y luego hacia el recto del insecto. La sangre concentrada en el estómago pasa en pequeñas cantidades hacia parte posterior del intestino (intestino pequeño) donde se digieren y absorben los nutrientes (García & Azambuja, 1991). Luego, se excreta el contenido del recto junto con gotas de orina. El insecto sufre grandes cambios al alimentarse, especialmente en el recto, donde el pH se alcaliniza, aumenta la osmolaridad y se reduce la concentración de proteínas y péptidos libres. Luego de la ingesta de sangre estos insectos permanecen por largos períodos de tiempo en ayuno (Kollien & Schaub, 1998).

El ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 5) comienza cuando el hospedador invertebrado se alimenta de sangre infectada de un hospedador vertebrado. Durante la alimentación, los tripomastigotes presentes en la sangre del vertebrado infectado son ingeridos por el insecto.

En el estómago del insecto los tripomastigotes se diferencian a esferomastigotes y subsecuentemente a epimastigotes. Estos últimos se dividen repetidamente por fisión binaria en el intestino medio y luego se adhieren a las células intestinales. En el recto, se adhieren a la cutícula rectal, y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que son eliminados en las heces y la orina inmediatamente después que el insecto se alimenta de sangre. De esta forma, los tripomastigotes presentes en las heces y la orina quedan depositados sobre el hospedador vertebrado, al cuál infectan penetrando por heridas o membranas mucosas.

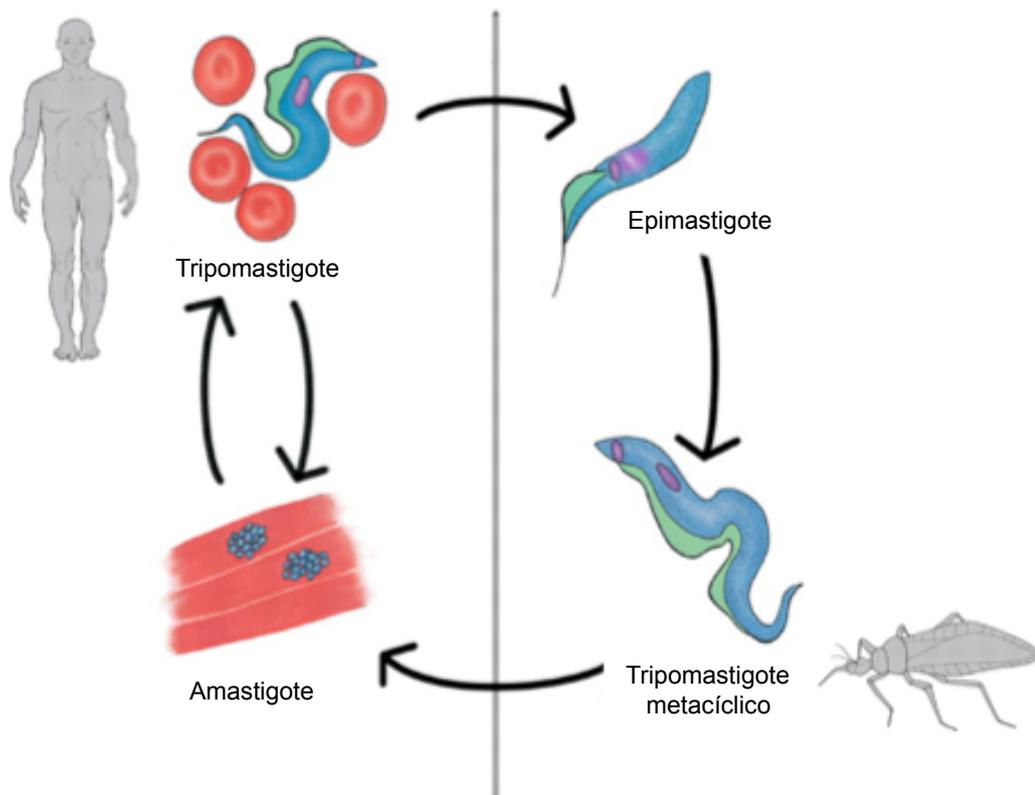


Figura 5: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Los tripomastigotes circulan en la sangre de los huéspedes infectados pero deben ingresar a las células y convertirse en amastigotes para replicarse. El insecto vector se infecta por ingestión de tripomastigotes al alimentarse de sangre de un mamífero infectado. Dentro del insecto los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes y se replican. Luego se transforman en tripomastigotes metacíclicos y pueden iniciar nuevas infecciones en mamíferos. Adaptado de Atwood et al, 2005.

En los mamíferos el ciclo comienza con la penetración de los tripomastigotes metacíclicos a diversas células, entre ellas macrófagos, fibroblastos o células epiteliales, por un proceso de endocitosis. Luego de la invasión, los parásitos se encuentran en una vacuola endocítica, denominada vacuola parasitófora, donde gradualmente se diferencian a amastigotes y casi simultáneamente rompen la membrana que rodea la vacuola. Posteriormente los amastigotes se dividen y luego de varios ciclos de división un gran número de amastigotes puede hallarse en el interior de cada célula. Un estímulo aún no caracterizado provoca la diferenciación de los amastigotes a epimastigotes intracelulares y luego a tripomastigotes sanguíneos, que se liberan al espacio intercelular por ruptura de la célula, ingresando al torrente sanguíneo o linfático. Estas formas son capaces de infectar nuevas células y amplificar la infección en el hospedador vertebrado. El ciclo vuelve a comenzar cuando un insecto se alimenta de sangre de un hospedador vertebrado infectado (De Souza, 2009, De Souza, 2002a, Kollien & Schaub, 2000).

METACICLOGÉNESIS

La diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos, denominada metaciclogénesis, es un paso fundamental en el ciclo vida de *T. cruzi* y es inducida por el estrés nutricional que enfrentan los parásitos al ingresar al intestino del insecto vector. En particular son importantes los aminoácidos Prolina, Glutamina/Ácido Glutámico y Asparagina. Al entrar al estómago, los parásitos se enfrentan a los componentes de la saliva y a enzimas digestivas, así como a grandes cambios en la temperatura, osmolaridad y suministro de nutrientes, donde los tripomastigotes se diferencian a esferomastigotes y subsecuentemente a epimastigotes (Figura 6). Luego de 1 a 4 semanas de infección, la densidad de parásitos aumenta en el intestino pequeño, donde la forma predominante es el epimastigote y luego en el recto, donde hay casi exclusivamente tripomastigotes metacíclicos. Al colonizar distintas regiones del intestino, *T. cruzi* se enfrenta a diferentes tipos de células epiteliales y superficies, pudiendo adherirse a todas estas regiones a través modificaciones en la flagelo y cuerpo celular (Kollien & Schaub, 1998).

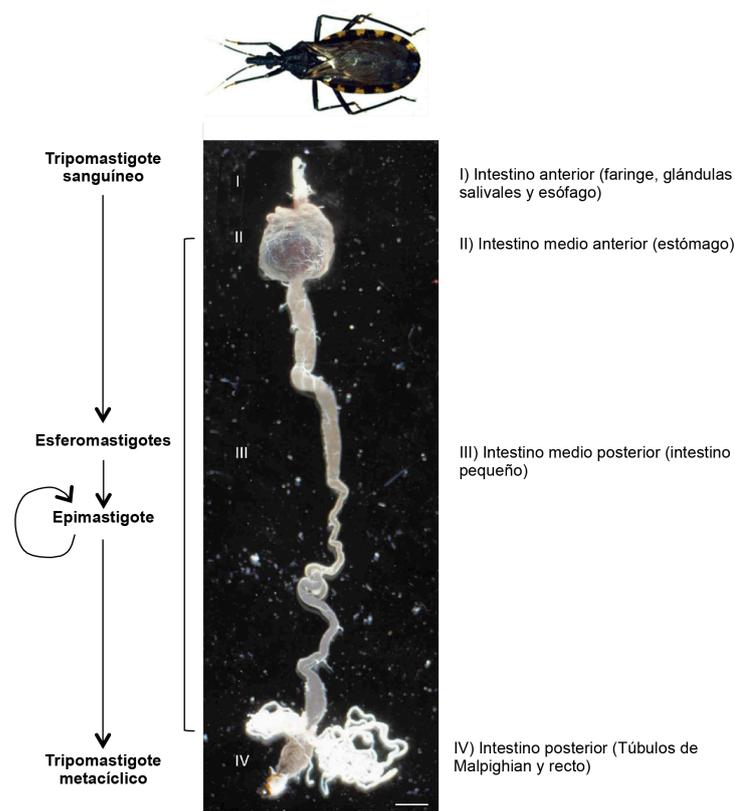


Figura 6: Metaciclogénesis de *Trypanosoma cruzi* en el insecto vector. Se indican formas evolutivas presentes en cada región del tracto digestivo del insecto. Sobre la figura se muestra una foto de *Triatoma infestans*. Adaptado de Kollien y Schaub, 2000.

En el recto, los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes, los cuales se adhieren a la cutícula rectal más eficientemente aparentemente mediante interacciones no específicas (Kleffmann et al., 1998).

La tasa de metacicloogénesis es afectada por el estado nutricional del vector y por la cepa de *T. cruzi*. En cuanto a los factores que gatillan la diferenciación, se ha reportado que son diversos, por ejemplo: el pH, la osmolaridad, los componentes de la hemolinfa, el contenido intestinal, el estrés metabólico y AMP cíclico (Revisado por Kollien & Schaub, 2000). La cepa de *T. cruzi* Dm28c es una de las que presenta mayores tasas de metacicloogénesis en el laboratorio. Esta cepa fue aislada originalmente de la zarigüeya *Didelphis marsupialis* y luego se obtuvo una población clonal por dilución límite e infección en ratones. El proceso de metacicloogénesis puede ser llevado a cabo *in vitro* utilizando medios mínimos, químicamente definidos, que simulan la composición de la orina del insecto. Uno de los medios más utilizados es la orina artificial de triatomino (TAU, del inglés “Triatomine Artificial Urine). Este medio no contiene proteínas, aminoácidos ni azúcares, lo que genera una situación de estrés nutricional para el parásito. Para inducir la diferenciación se deben incubar epimastigotes, previamente cultivados en un medio rico, en medio TAU durante dos horas y subsecuentemente en TAU suplementado con glucosa y los aminoácidos Glutamato, Prolina y Aspartato (TAU3AAG), durante 96 horas. En estas condiciones los parásitos se adhieren a la superficie de la botella de cultivo y comienzan a diferenciarse imitando lo que sucede en el recto del insecto vector (Contreras et al., 1988).

1.2.2 MORFOLOGÍA DE LOS ESTADIOS DEL CICLO DE VIDA

Como se observa en la figura 5 y 6, la forma del parásito varía de acuerdo al estadio del ciclo de vida en el que se encuentre. Las tres formas evolutivas principales: tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes, se pueden diferenciar mediante microscopia óptica teniendo en cuenta la morfología general y en particular la posición relativa entre el flagelo y el núcleo (Ferreira et al., 2008).

AMASTIGOTE

Forma redondeada (3-6 μm), con el kinetoplasto en forma de barra o bastón en la región anterior del núcleo y el flagelo corto (no visible al microscopio óptico) que apenas emerge del bolsillo flagelar (Figura 7A). Esta forma replicativa es intracelular, se halla en el interior de las células de hospedadores infectados y se puede obtener por infección de células en cultivo. Se ha descrito una forma de transformar epimastigotes en amastigotes *in vitro*, pero, si bien son morfológicamente parecidos, existen dudas concretas sobre la relación de estos amastigotes axénicos y los intracelulares (Contreras et al., 2002).

TRIPOMASTIGOTE

Forma alargada (20-25 x 2 μm), con el kinetoplasto redondeado localizado en la región posterior del núcleo. El flagelo emerge de un bolsillo flagelar en la zona posterior y se adhiere a lo largo del cuerpo del parásito a través de una membrana ondulante, volviéndose libre en la región anterior (Figura 7B). Esta forma es altamente infectiva, carece de capacidad replicativa y puede ser encontrada en la porción posterior del intestino del insecto vector y en la sangre y el espacio intercelular de los hospedadores vertebrados. Si bien son morfológicamente iguales, existen evidencias de transcriptómica y proteómica que indican que los tripomastigotes metacíclicos y los sanguíneos serían fisiológicamente diferentes (Cordero et al., 2009, Paba et al., 2004).

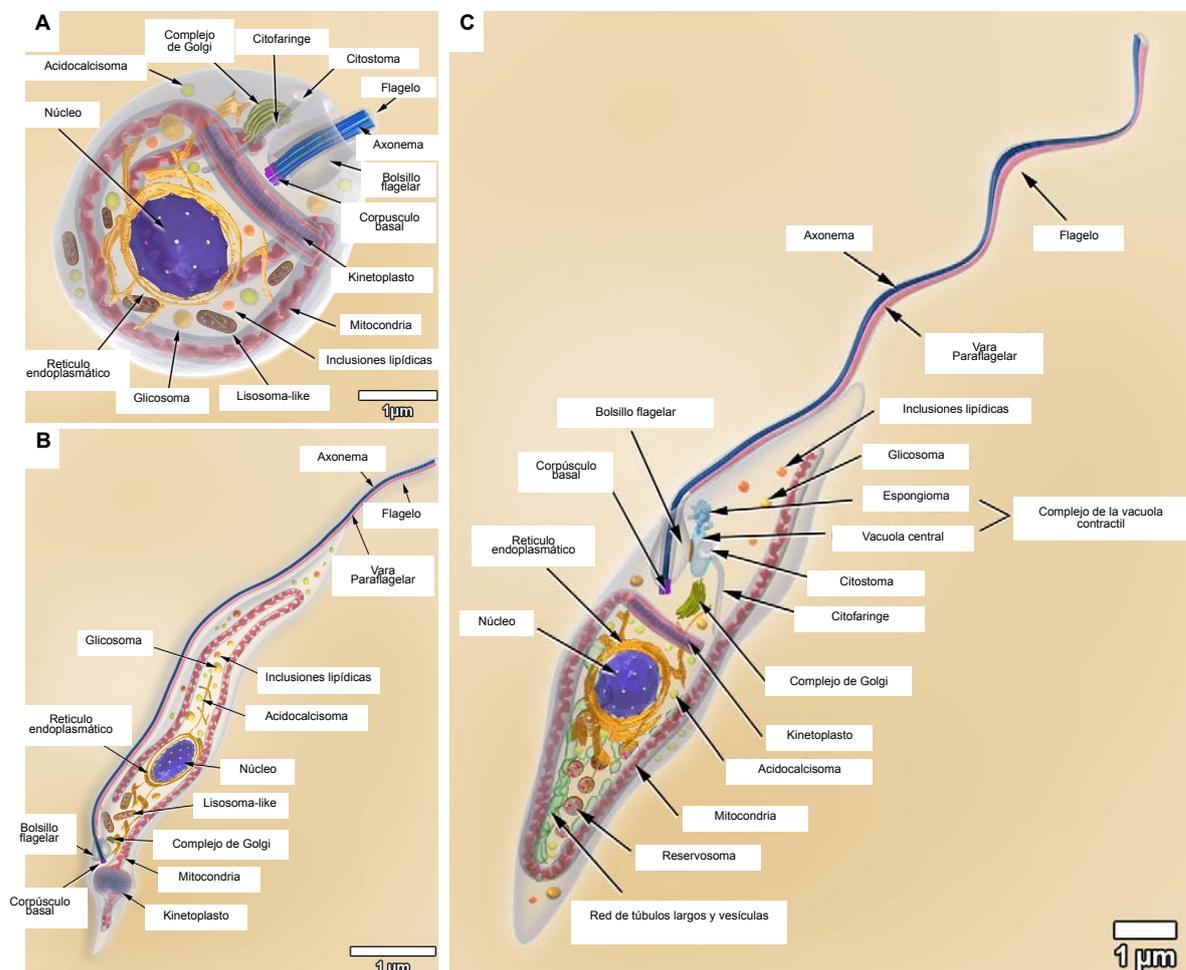


Figura 7: Representaciones las diferentes formas de *T. cruzi*. A- Amastigote. B- Tripomastigote. C- Epimastigote. Se indican las organelas y estructuras celulares más importantes. Adaptado de Teixeira et al, 2012.

EPIMASTIGOTE

Forma alargada (20-40 μm de largo), con el kinetoplasto en forma de barra o bastón localizado en la región anterior al núcleo. El flagelo emerge del bolsillo flagelar mediante una

abertura lateral y recorre adherido la porción del cuerpo del parásito, volviéndose libre en la región anterior (Figura 7C). Es la forma replicativa en el tubo digestivo del insecto vector y puede ser mantenido en cultivos axénicos (De Souza, 2002b).

En la figura 7 además podemos observar las organelas típicas de células eucariotas y algunas organelas y estructuras particulares de estos organismos que serán detalladas a continuación.

1.2.3 EL NÚCLEO Y LA ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA

El núcleo de *T. cruzi* y otros tripanosomátidos tiene una organización estructural similar a la otros eucariotas. Es pequeño, mide aproximadamente 2,5 μm y tiene una membrana nuclear típica con poros de 80 nm de diámetro. Como en todas las células eucariotas, existe una continuidad entre la cisterna perinuclear y el retículo endoplasmático. En células interfásicas, la cromatina se encuentra aglomerada en la periferia del núcleo, por debajo de la membrana nuclear interna. Ocasionalmente, estos cúmulos de cromatina también son encontrados en la región central del núcleo. Los cromosomas son difíciles de distinguir porque no se condensan en ningún estadio del ciclo de vida de *T. cruzi*. Sin embargo, utilizando electroforesis de campo pulsado se han podido identificar 41 cromosomas en la cepa de referencia CL Brener, de entre 106,4 y 110,7 Mb, con aproximadamente 12.000 genes codificantes para proteínas por genoma haploide. Otras cepas de *T. cruzi* poseen genomas sensiblemente más pequeños, pero con un número similar de genes. El tamaño promedio de estas secuencias codificantes (CDSs, del inglés “Coding Sequences”) se estimó en 1513 pb, con una densidad de genes de 385 por Mb. Las regiones intergénicas por su parte, tendrían un largo promedio de 1024 pb. Se encontraron además, 115 genes para ARNt, 219 de ARNr, 192 de ARN guía y otros tantos ARNs pequeños. Al momento de la resolución del primer genoma de *T. cruzi*, el 50,8% de los genes codificantes para proteínas fue asignado funcionalmente en base a comparación con proteínas o dominios conocidos y el resto se asignaron como proteínas hipotéticas conservadas (~43%) o proteínas hipotéticas (~8%) (El-Sayed et al., 2005). Si bien en los casi diez años transcurridos desde la publicación del primer genoma se ha avanzado en la caracterización funcional del mismo, el número de genes de función desconocida sigue siendo muy importante. Los cromosomas de *T. cruzi* presentan en sus extremos telómeros típicos y contienen secuencias ricas en GC que actúan como regiones centroméricas. También se ha encontrado un gran número de secuencias repetitivas que corresponden al 10% del genoma total y podrían estar involucradas en la formación de centrómeros aunque esta función es cuestionable (Elias et al., 2003).

Durante la división celular ocurren cambios en la organización del material nuclear. Cuando comienza este proceso, en el momento de la replicación del cuerpo basal (centro organizador del flagelo eucariota), las primeras evidencias de división pueden observarse en el núcleo. La cromatina localizada por debajo de la membrana nuclear interna y el nucléolo desaparecen, dispersándose por todo el núcleo, dándole al núcleo un aspecto homogéneo. Inmediatamente después de la replicación del cuerpo basal, pero antes de la división del kinetoplasto, aparecen microtúbulos dentro del núcleo. Luego el núcleo adquiere una forma más oval y el kinetoplasto se divide. Estas dos nuevas estructuras se mueven hacia los extremos y el núcleo se elonga y se divide por constricción en la mitad. Luego de la división, la cromatina y el nucléolo se reorganizan y los microtúbulos desaparecen. Durante todo el proceso la membrana nuclear permanece intacta y no se han observado centriolos conectados a los microtúbulos. No se conoce con precisión la función de estos microtúbulos intranucleares pero es probable que, al igual que ocurre en metazoos, estén ayudando a separar y mover el material genético. En tripomastigotes no se observa la presencia de un nucléolo, esto se correlaciona con la disminución en la tasa de transcripción por la ARN polimerasa I y II en este estadio evolutivo (Lacomble et al., 2010, De Souza, 2002a).

La cromatina de tripanosomátidos se organiza en filamentos de 10 nm y presenta nucleosomas arreglados de manera irregular. Además, *T. cruzi* contiene histonas divergentes con diversas modificaciones post-traduccionales y versiones variantes de histonas. En epimastigotes hay pequeñas cantidades de cromatina densamente empaquetada que se ubica en la periferia nuclear. En cambio en tripomastigotes, la cromatina densa ocupa una gran parte del compartimento nuclear. No existe evidencia de formación de heterocromatina típica aunque esta reorganización entre los distintos estadios parece reflejar las diferentes tasas de transcripción observadas (Spadiliero et al., 2002).

HISTONAS

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) de histonas actúan como marcas que permiten, o previenen, interacciones requeridas para la transcripción, replicación y reparación en el núcleo eucariota. Como se ampliará más adelante, las modificaciones reversibles como acetilación y metilación son catalizadas por enzimas específicas y permite que las histonas sean reconocidas por proteínas que presentan bromodominios o cromodominios, respectivamente. En términos generales, estas modificaciones afectan la estructura y condensación de la cromatina. Por ejemplo, la eucromatina que se transcribe contiene mayormente histona H3 tri-metilada en la lisina 4 e histona H4 acetilada en la lisina 16, mientras que la heterocromatina está enriquecida en histona H3 tri-metilada en lisina 9 en vertebrados. Las histonas de tripanosomátidos también son divergentes en los sitios que

sufren MPT, por lo cual no es sencillo comparar la función de las modificaciones con las de vertebrados, que se encuentran mucho más estudiadas. Por otro lado, las enzimas que modifican histonas, así como los elementos regulatorios involucrados en su reconocimiento también están poco conservados (Elias et al., 2009). La histona H1 de kinetoplastidos presenta una menor longitud que sus ortólogas de eucariotas superiores, debido a la ausencia del dominio globular. Esto también ha sido observado en *Entamoeba*, ciliados y dinoflagelados. Dado que el dominio globular, así como el extremo carboxilo terminal de la histona H1 son necesarios para la condensación de la cromatina en estructuras de mayor orden, su ausencia podría explicar la ausencia de condensación en la estructura de fibra de 30 nm observada en estos organismos (Povelones et al., 2012).

TRANSCRIPCIÓN Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TRIPANOSOMÁTIDOS

Los tripanosomátidos poseen tres ARN Polimerasas como el resto de los eucariotas pero sus mecanismos transcripcionales son particulares. Es importante destacar que la mayor cantidad de resultados se obtuvieron utilizando como modelo *T. brucei*, ya que posee características que hacen más sencillo su estudio además de poseer diversas herramientas genéticas experimentales. En este organismo, la ARN Polimerasa I (ARNP I) transcribe genes que codifican para pre-ARNs ribosomales y también genes que codifican para proteínas (una característica que *T. cruzi* y *Leishmania* spp. no comparten). Particularmente, transcribe genes que codifican para las proteínas variables de superficie (VSG, del inglés "Variable Surface Glycoproteins"), que recubren la superficie celular de la forma sanguínea de *T. brucei* y también para las prociclinas que recubren al parásito cuando se encuentra en el estadio dentro del insecto vector (*Glossina* spp.). Las unidades transcripcionales de Pol I que contienen a los genes que codifican para VSGs se encuentran en regiones subtelo méricas de los cromosomas denominadas sitios de expresión teloméricos (ES, del inglés "Expression Sites"). Esta expresión monoalélica se da en una zona restringida del núcleo, un compartimento no nucleolar, de la cual son excluidos los ES no activos. El requerimiento de altos niveles de expresión de las VSGs y prociclinas probablemente es la razón por la cual éste parásito adquirió la capacidad de utilizar la ARNP I para su transcripción. A diferencia de *Leishmania* y *T. cruzi*, que tienen estadios intracelulares en el hospedador mamífero, *T. brucei* se mantiene sólo extracelularmente y ha desarrollado una manera única de evadir el sistema inmune del hospedador cambiando su cubierta de proteínas de superficie. Por otra parte, el hecho de que en estos parásitos la adición de la caperuza en los transcritos está dada por una reacción de trans-*splicing*, implica que la transcripción y la adición de la caperuza están desacopladas, lo que permite que la síntesis

primaria de los transcritos también pueda darse por otra ARN polimerasa que no sea la ARNP II (Günzl et al., 2003).

La transcripción de genes que codifican para proteínas en tripanosomátidos difiere del resto de los eucariotas en dos aspectos importantes. Primero, existen arreglos de genes que en algunos casos pueden llegar ser mayores a 100, que se transcriben en unidades de transcripción polisistrónicas (PTU, del inglés “Polisistronic Transcription Units”). Esta organización es similar a los operones procariotas excepto que estas unidades no contienen genes relacionados entre si como ocurre en bacterias. Además, a partir de estos transcritos primarios policitrónicos, los ARNm individuales son separados post-transcripcionalmente por reacciones acopladas de *trans*-splicing y poli-adenilación. La ARN Polimerasa II transcribe ARNs mensajeros y algunos ARN pequeños, entre ellos uno específico de estos organismos, el SL (del inglés “Spliced Leaders”), que es fusionado por *trans*-splicing a la región 5´ de todos los ARNs mensajeros. Por otro lado, la RNAP II de tripanosomátidos no contiene el dominio C-terminal característico las polimerasas eucariotas (Ejchel et al., 2003). Esta ausencia es compatible con la falta de promotores para ARNP II, salvo para los genes SL, los cuales se arreglan en tándem pero son transcritos cada uno a partir de su propio promotor. El transcripto del gen SL es el único pre-ARNm con caperuza conocido en estos organismos. Los pre-ARNm se procesan en unidades traducibles y estables por *trans*-splicing de secuencias de 30-40 nucleótidos derivadas del ARN-SL en el extremo 5´ de cada gen, seguido de la adición de una cola de poli(A) en el extremo 3´. Este conjunto inusual de eventos de procesamiento permite que una sola ronda de transcripción de la ARNP II produzca numerosos mensajeros funcionales. Así, los tripanosomátidos evitarían el proceso de adición de la caperuza de forma co-transcripcional presente en muchos otros eucariotas, el que requiere pausar a la ARNP II y reclutar otras actividades enzimáticas. La transcripción policistrónica también les permitiría a estos organismos evitar el reinicio de la transcripción repetitivo a lo largo del cromosoma. Además, muchos de los factores basales de la transcripción para la Pol II son muy divergentes o no están presentes en *T. cruzi* (Elias et al., 2009). En cada PTU, los genes son transcritos en la misma hebra, pero la transcripción de dos unidades vecinas puede ser convergente o divergente (Figura 8).

Las regiones entre PTUs se conocen como regiones de cambio de hebra (SSR, del inglés “Strand Switch Region”). La ARN Polimerasa II comienza a transcribir en estas regiones entre dos PTUs divergentes y termina en regiones de cambio de hebra que contienen PTUs convergentes (Martínez-Calvillo et al., 2003).

En *T. cruzi* se ha observado que las regiones de cambio de hebra divergentes contienen niveles elevados de histona H4 acetilada (Respuela et al., 2008). En *T. brucei* se ha descrito la presencia de variantes de histonas así como distintas MPTs de histonas en los sitios de inicio y fin de la transcripción, lo que contribuiría a una cromatina más laxa y compensaría la aparente falta de promotores para ARNP II (Siegel et al., 2009).

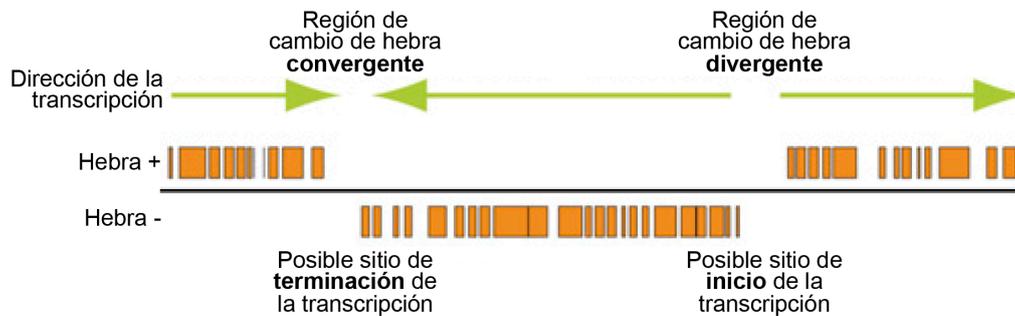


Figura 8: Esquema de las regiones de cambio de hebra divergentes y convergentes. En naranja se indican los marcos abiertos de lectura y en verde las flechas indican la dirección de la transcripción. Adaptado de Siegel et al, 2009.

La ARN Polimerasa III es responsable de la transcripción de ARNs de transferencia, ARNs pequeños nucleares (ARNpn) y el ARN de la subunidad ribosomal 5S. La transcripción de los ARNpn depende de elementos regulatorios localizados en el gen de ARNt adyacente (Daniels et al., 2010). En tripanosomátidos hay un número pequeño de ARNt presentes y estos presentan baja sintonía, lo que indicaría que las regiones del genoma donde se encuentran los genes transcritos por ARNP III no son tan importantes como las regiones de genes que codifican para proteínas (Padilla-Mejía et al., 2009).

Como se detalló anteriormente, durante su ciclo de vida los tripanosomátidos sufren grandes cambios morfológicos y metabólicos. Estos cambios demandan una regulación de la expresión génica diferencial entre los distintos estadios y también durante su ciclo celular. Se sabe que los genes que codifican para las VSGs y prociclinas son regulados a distintos niveles durante el ciclo de vida de *T. brucei*. Son regulados en el inicio de la transcripción por sus promotores para ARNP I, también durante la elongación de la transcripción y finalmente a nivel de la estabilidad de los ARNm mediante secuencias en su extremo 3' no traducidos. Por otro lado, la mayoría de los genes traducidos por la ARNP II muestran pocos cambios en los niveles de expresión durante el ciclo de vida en este organismo. Se postula que la regulación diferencial de estos genes ocurre a nivel post-transcripcional, principalmente a través de la interacción de proteínas de unión al ARN como elementos en los extremos 3' no traducibles (Daniels et al., 2010). Estas proteínas de unión a ARN modificarían la estabilidad y la traducibilidad de los mensajeros, estableciendo "operones

post-transcripcionales”, sin embargo los mecanismos mediante los cuales esto ocurriría no son del todo conocidos.

1.2.4 ORGANELAS PARTICULARES

MITOCONDRIA Y KINETOPLASTO

Trypanosoma cruzi, así como otros miembros de la familia Trypanosomatidae, tienen una sola mitocondria ramificada que se extiende a lo largo de todo el cuerpo celular. En una porción de la mitocondria, cerca del cuerpo basal, se encuentra el kinetoplasto (Figura 7). El mismo se sitúa cerca del núcleo y su forma y estructura varía según el estadio del ciclo de vida. Es un material filamentososo, compuesto por especies circulares de ADN conocidas como maxi y mini círculos, que se ordena en columnas de fibras muy empaquetadas orientadas paralelamente al eje longitudinal del parásito. Se localiza en la matriz mitocondrial perpendicular al eje del flagelo y está conectado al cuerpo basal. Debido a esta conexión, la posición del kinetoplasto define en que región celular se ubica el cuerpo basal y, en consecuencia, la localización del flagelo. La estructura completa se asemeja a un disco cóncavo de 0,1 μm y representa del 20 al 25% del ADN total del parásito. La replicación del kinetoplasto ocurre en un momento definido del ciclo celular, poco antes del comienzo de la fase S. Luego de la replicación, este debe ser posicionado correctamente de manera que durante la división de la mitocondria cada célula hija reciba una sola organela con un solo kinetoplasto. Este proceso es mediado por el movimiento del cuerpo basal, ya que un kinetoplasto permanece conectado a esta estructura del viejo flagelo mientras que el otro segrega con el cuerpo basal del nuevo flagelo (Lacomble et al., 2010).

El kinetoplasto está compuesto de 20.000 a 30.000 minicírculos asociados entre sí. Los minicírculos tienen un tamaño de entre 0,5 a 2,5 kb y los maxicírculos varían de 20 a 40 kb. También existen proteínas asociadas con el kinetoplasto, como la Topoisomerasa tipo II, ADN Polimerasa mitocondrial, proteínas condensadoras del ADN mitocondrial y proteínas de shock térmico mitocondriales. Los maxicírculos y el ADN mitocondrial de otros eucariotas, tiene un tamaño comparable y poseen información genética similar: ARN ribosomales, algunas proteínas del metabolismo energético y un set de ARNs de transferencia. Los minicírculos, mayoritariamente codifican para pequeños ARNs guía (ARNg) que controlan la especificidad del proceso de edición de los ARNm en kinetoplastos. Este proceso de edición consiste en la inserción o delección de uridinas en los transcritos del ADN de los maxicírculos (De Souza, 2009, De Souza, 2002a, Aphasizhev & Aphasizheva, 2014).

GLICOSOMA

Desde hace muchos años se ha descrito en tripanosomátidos la presencia de estructuras citoplasmáticas membranosas esféricas con una matriz homogénea similares a los peroxisomas de mamíferos (que están rodeadas de una sola membrana y contienen catalasas y oxidasas en su interior). En estas organelas se encuentran las enzimas glicolíticas involucradas en la conversión de glucosa a 3-fosfoglicerato proceso que en otros organismos ocurre exclusivamente en el citosol. Por este motivo se decidió llamar a estos peroxisomas especializados “glicosomas” (Figura 7). Las enzimas encontradas en los glicosomas tienen mayores puntos isoeléctricos que las presenten en el citosol de otros eucariotas. Además, estas estructuras contienen catalasas y mas de 50 enzimas involucradas en diversas vías metabólicas (metabolismo de peróxido, β -oxidación de ácidos grasos, síntesis de fosfolípidos, entre otras). El glicosoma no posee genoma, por lo tanto, todas las proteínas encontradas en su interior son codificadas por genes nucleares, traducidas en ribosomas libres y luego importadas post-traduccionalmente a esta organela. Existen varias señales de localización a peroxisomas descriptas (De Souza, 2009, De Souza, 2002b).

ACIDOCALCISOMA

Son organelas acídicas cubiertas de membrana que poseen una matiz electro-densa homogénea y son capaces de transportar protones y calcio. Además, contienen fosforo, sodio, magnesio y zinc y pequeñas cantidades de cloro, potasio y azufre. En algunos tripanosomátidos también se encontró que poseen hierro. Las bajas cantidades de azufre sugieren una baja cantidad de proteínas presentes pero se ha detectado la presencia de fosfato y oxígeno lo que sugiere presencia de carbohidratos. Los acidocalcisomas están involucrados en el almacenamiento de estos compuestos especialmente pirofosfato inorgánico y poli-fosfatos (PPI). El PPI parece ser el fosfato de alta energía más abundante en *T. cruzi*, el cual contribuye a la homeostasis de pH y a la osmoregulación (Docampo et al., 2005).

1.2.5 LA SUPERFICIE CELULAR Y EL CITOESQUELETO

La superficie celular de los tripanosomátidos está compuesta por la membrana plasmática y una capa de microtúbulos subpeliculares. Se sabe que en la mayoría de los organismos eucariotas existen microtúbulos y microfilamentos asociados con la membrana plasmática, pero en ninguno esta asociación es tan fuerte como en estos organismos donde ambos componentes permaneces asociados aún luego de la lisis celular y aislamiento de la fracción enriquecida en membranas. En la membrana plasmática, un gran número de proteínas se

encuentran asociado a la misma a través de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (ancla GPI) o a través de grupos prenilo incorporados a las proteínas (De Souza, 2009).

LOS MICROTÚBULOS SUBPELICULARES

En tripanosomátidos hay tres clases de microtúbulos: los flagelares, los mitóticos y los subpeliculares. Estos últimos componen el citoesqueleto y se organizan helicoidalmente a lo largo del eje de la célula con un espaciado regular de 18 a 22 nm y una longitud variable (Schneider et al., 1987). Los microtúbulos subpeliculares son característicos de la familia Trypanosomatidae y están conectados entre sí por filamentos cortos de naturaleza desconocida. Esta asociación es la responsable de otorgarle rigidez a la célula, volviéndola resistente a la ruptura por medios mecánicos. Los microtúbulos subpeliculares están espaciados regularmente y su número está relacionado con el diámetro de la célula, cada uno de ellos está compuesto de 13 protofilamentos con un espesor de 5 nm en la parte central. Además, se nuclean en distintos puntos a lo largo del arreglo y se orientan con sus extremos (+) hacia el polo posterior de la célula. En las región anterior y posterior de *T. cruzi*, el número de microtúbulos es menor que entre el núcleo, kinetoplasto y en la región donde se ubica el complejo de Golgi. Mediante métodos bioquímicos se ha detectado la presencia de seis tipos de tubulinas en tripanosomátidos: alfa y beta, que constituyen las subunidades de los microtúbulos; gama, que es un componente menor responsable de la nucleación de los microtúbulos; así como delta, épsilon y zeta (De Souza, 2002b).

EL FLAGELO

El flagelo es esencial para la viabilidad en tripanosomátidos, es el responsable de la movilidad y tienen roles fundamentales en la morfogénesis, división celular, transmisión y patogénesis en estos organismos.

Un solo flagelo se origina en el cuerpo basal con el extremo (+) de los microtúbulos del axonema dispuestos anteriormente y contribuye al posicionamiento del cuerpo basal (Figura 9). El **cuerpo basal** es una estructura en forma de barril que consiste de nueve tripletes de microtúbulos periféricos y no tiene par central. El flagelo sale de la célula a través de una abertura en el arreglo de microtúbulos y la correspondiente invaginación de la membrana plasmática que forma el bolsillo flagelar. Luego, se extiende a lo largo del cuerpo celular hacia el polo anterior y se mantiene en su lugar a través de la **zona de unión del flagelo o FAZ** (del inglés “Flagellum Attachment Zone”), que está compuesta de uniones transmembrana punteadas. La FAZ incluye filamentos citoplasmáticos junto con un cuarteto de microtúbulos subpeliculares especializados que esta asociado con el retículo membranoso, que es una continuación del retículo endoplasmático (Figura 9, FER del inglés

“Flagellum Endoplasmic Recticulum”). Cerca del cuerpo basal se nuclean estos cuatro microtúbulos citoplasmáticos que pasan alrededor del bolsillo flagelar y a través de la FAZ hasta el polo anterior de la célula. El extremo (+) del cuarteto se encuentra en el polo anterior de la célula, con polaridad opuesta al arreglo de microtúbulos subpeliculares (Langousis & Hill, 2014).

El **bolsillo flagelar** es una región altamente especializada de la superficie de los tripanosomátidos y es la única región sin la capa de microtúbulos subpeliculares. Además, la membrana que recubre el bolsillo difiere de la que recubre el cuerpo basal y la membrana flagelar en cuanto a localización de proteínas e inclusive de algunas enzimas. Su característica principal es que es el lugar donde ocurre la endo y exocitosis (De Souza, 2002a). Esta estructura se divide en varios subdominios y puede usarse para definir uno de los polos de la célula. Su lumen contiene una matriz rica en carbohidratos cuya composición y función aún no se conoce (Field & Carrington, 2009). Hay fronteras claras que definen los subdominios del bolsillo flagelar, los más predominantes son el collar (en el cuello donde el flagelo emerge) (Figura 9) y el collarete (punto donde el flagelo ingresa al bolsillo y está ubicado próximo al cuerpo basal). Solo se conoce un componente del collar en *T. brucei*, que se denomina BILBO1 (Bonhivers et al., 2008). Esta proteína es esencial para la formación del bolsillo y su silenciamiento causa una disrupción de la exocitosis y endocitosis así como un posicionamiento incorrecto del flagelo durante la citocinesis.

El **axonema** tiene una estructura básica, similar a otros flagelos, con un patrón 9+2 de microtúbulos axonemales. A medida que el cuerpo basal se extiende hacia fuera de la célula, los tripletes se convierten en dobletes, formando la zona de transición del axonema (Figura 8). Como se detallo anteriormente, la primera parte del axonema emerge del citoplasma a través del bolsillo flagelar. El flagelo esta recubierto de una membrana propia a partir de la región del collar y existen uniones laterales del flagelo con el cuerpo celular que varían según el estadio del ciclo de vida. Por ejemplo, los tripomastigotes solo tiene la punta del flagelo libre mientras que en epimastigotes la mayor parte del flagelo se encuentra libre del cuerpo celular. En los tripomastigotes, cuando el flagelo comienza a moverse se propaga una onda a través del mismo e induce un movimiento aparente del cuerpo celular, dando la impresión visual de una membrana ondulante.

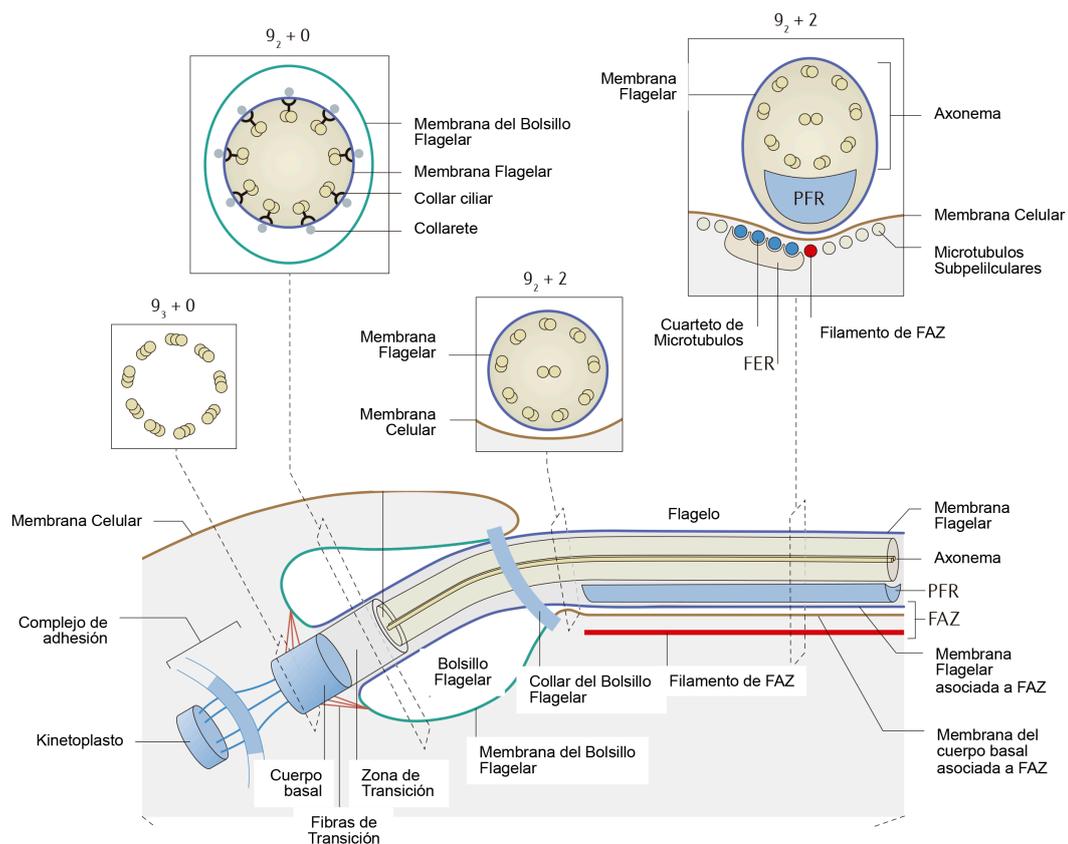


Figura 9: Diagrama del flagelo en el sitio que emerge del bolsillo flagelar en el extremo posterior de la célula. El flagelo está constituido por microtúbulos que se arreglan con patrones característicos (panel superior). El axonema surge del cuerpo basal a través de la zona de transición y está conectado lateralmente a la membrana celular por la zona de adhesión del flagelo (FAZ). Las estructuras extra-axonemales que se encuentran dentro de la membrana flagelar son la vara paraflagelar (PFR) y el collar ciliar. Existe un complejo tripartito de adhesión que une el cuerpo basal con el kinetoplasto y fibras de transición que conectan el cuerpo basal con el bolsillo flagelar. Adyacente al filamento que forma la FAZ se encuentran los microtúbulos subpelliculares, el cuarteto de microtúbulos y el retículo endoplasmático de FAZ (FER). Adaptado de Langousis y Hill, 2014.

Finalmente, la otra estructura presente en el flagelo de tripanosomátidos es la **vara paraflagelar** (PFR, del inglés “Paraflagellar Rod”), que corre paralela al axonema desde que el flagelo emerge del bolsillo flagelar. En cortes transversales de la PFR, se distinguen tres dominios estructurales: el proximal, el intermedio y el distal con respecto a la interfase axonema-PFR. La función de la PFR aún permanece enigmática, aunque algunos reportes indican que tendría roles tanto estructurales como regulatorios.

Se ha descrito en *T. brucei* que la vara paraflagelar está compuesta por dos proteínas mayoritarias, PFR1 y PFR2, y otros componentes minoritarios. Mutantes en estas proteínas muestran un fenotipo de movilidad reducida o inmovilidad completa en *T. brucei* (Gadelha et al., 2006). Por otro lado, Hughes y colaboradores sugieren que la vara paraflagelar podría

funcionar como un resorte biomecánico y absorber y transmitir la energía que se produce durante el movimiento del flagelo (Hughes et al., 2012).

EL CITOESQUELETO Y LA DIVISIÓN CELULAR

La fuerte asociación de membrana y citoesqueleto existente en los tripanosmátidos representa un desafío durante la división celular, ya que estos deben ser segregados correctamente. En la figura 10 se esquematiza la división celular en epimastigotes de *T. cruzi* que incluye síntesis (S) de ADN del núcleo (circulo) y kinetoplasto (K), crecimiento del nuevo flagelo (rojo), segregación del kinetoplasto, formación de un nuevo bolsillo flagelar (BF) y finalmente, la citocinesis (C). Una vez que la síntesis del ADN concluye comienza a elongarse el flagelo. El nuevo flagelo sale del bolsillo a las 5 horas de iniciado el ciclo, luego de entrar en la fase G2 y permanece corto durante la mitosis (M). Este nuevo flagelo continúa creciendo libre del cuerpo celular durante la citocinesis. El núcleo y el kinetoplasto se segregan casi simultáneamente en *T. cruzi*, mientras que en la forma procíclica de *T. brucei* el kinetoplasto se segrega cuando el núcleo se encuentra en fase G2. Estas diferencias pueden atribuirse a la localización del kinetoplasto en relación al núcleo en estos organismos.

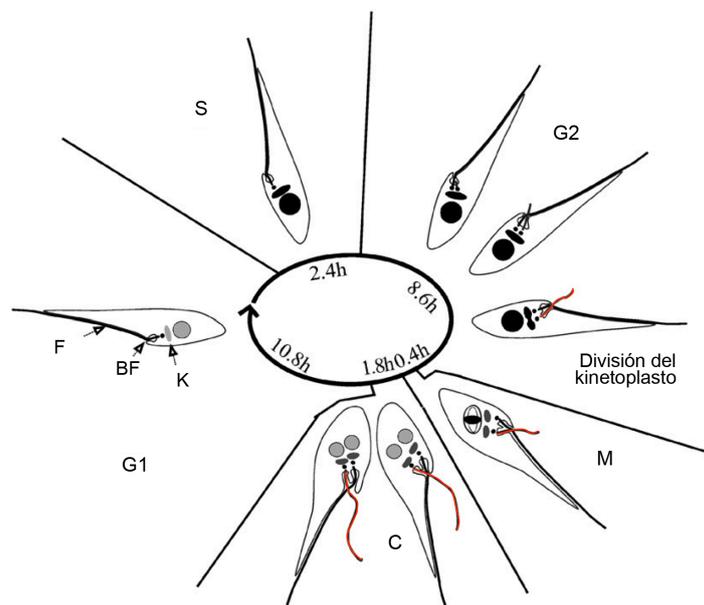


Figura 10: Representación esquemática de las alteraciones morfológicas que ocurren durante el ciclo celular en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Se indican los estadios del ciclo celular nuclear como G1, S (síntesis), G2, M (mitosis) y C (citocinesis). El nuevo flagelo se indica en rojo y el viejo en negro. El nuevo flagelo emerge del bolsillo flagelar cuando las células se encuentran en el estadio G2 y aquí es cuando el kinetoplasto se segrega. Una vez completada la mitosis, el bolsillo flagelar se segrega y las células entran en citocinesis produciéndose dos células idénticas. La duración de cada etapa se indica en el círculo central, pero estos tiempos pueden variar entre cepas y en función de la composición del medio de cultivo utilizado. Adaptado de Elias et al, 2007.

El nuevo kinetoplasto en *T. brucei* migra a una posición posterior al núcleo luego de su segregación y antes de la mitosis nuclear para poder generar dos nuevas células hijas idénticas (Matthews, 2005). En el caso de epimastigotes de *T. cruzi*, no hay migración del kinetoplasto hasta que las dos células hijas se forman y su separación es asimétrica. Se observó también en *T. cruzi* que antes de la mitosis, el bolsillo flagelar comienza a dividirse, inicialmente cerca del kinetoplasto y luego se mueve hacia la superficie externa de la célula. Los dos bolsillos se separan luego durante la citocinesis (Elias et al., 2007). Esta es otra diferencia con *T. brucei*, donde la segregación del bolsillo flagelar es uno de los primeros eventos que ocurre luego de la duplicación del cuerpo basal y la formación del nuevo flagelo durante la fase S.

Entonces, durante el ciclo celular, existen distintos eventos que involucran directamente a procesos mediados por microtúbulos. Estos incluyen: crecimiento de la célula por agregado de nuevos microtúbulos subpeliculares, movimiento del cuerpo basal, crecimiento de un nuevo flagelo, mitosis y citocinesis (Robinson et al., 1995, Sasse & Gull, 1988).

1.3 ACETILACIÓN DE PROTEÍNAS

Hasta aquí se ha descrito al modelo de estudio, *Trypanosoma cruzi*, resaltando sus peculiaridades biológicas así como su importancia como agente causal de la Enfermedad de Chagas. En los siguientes capítulos se explicará la importancia de la acetilación en la regulación de los procesos celulares y como los bromodominios participan en diferentes mecanismos asociados a esta modificación post-traducciona. Finalmente, se discutirá los avances en el desarrollo de inhibidores de bromodominios y su utilización para el tratamiento de diversas enfermedades.

1.3.1 ACETILACIÓN COMO MECANISMO GLOBAL DE REGULACIÓN

La acetilación de lisinas es una modificación post-traducciona reversible y altamente regulada que está involucrada en diversos procesos celulares. Históricamente, se la ha asociado con la regulación de la transcripción nuclear ya que esta modificación fue descubierta inicialmente en histonas en la década del 60 (Allfrey & Mirsky, 1964, Allfrey et al., 1964). Antes de este descubrimiento, el concepto de epigenética ya había sido introducido en 1939 (Waddington, 1939). Posteriormente, la epigenética fue definida como cambios heredables en la expresión génica que no se deben a alteraciones en la secuencias de ADN (Holliday, 1987). En la última década, se ha puesto en claro que las modificaciones post-traduccionales de la histonas tienen un rol central en la regulación de la transcripción. Estas modificaciones son en algunos casos heredables y se han asociado al fenómeno llamado "imprinting". Las colas N-terminales de la histonas protruyen de la estructura

globular del nucleosoma y pueden sufrir acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ribosilaciones, biotilaciones, cirtrulinaciones y SUMOilaciones (Kouzarides, 2007). Cada modificación puede alterar la estructura de la cromatina pero el estado global de la misma es determinado por la combinación de ellas. Este código complejo, denominado “Código de Histonas”, juega un rol preponderante en la regulación de la transcripción, el mantenimiento de la integridad del genoma y constituye la memoria epigenética de las células (Jenuwein & Allis, 2001).

La acetilación se caracteriza por la adición de grupos acetilo a proteínas, que neutraliza la carga positiva y modifica el tamaño del aminoácido modificado, cambiando también la hidrofobicidad local de la proteína. Estas variaciones tienen un impacto significativo en la conformación y función del polipéptido, por ejemplo en su actividad enzimática. Además, la acetilación de lisinas genera sitios de unión para otras proteínas a través de bromodominios, que son dominios proteicos capaces de reconocer esta modificación (Jenuwein & Allis, 2001). La acetilación de lisinas se encuentra en todos los dominios de la vida, desde bacterias hasta humanos pero su rol biológico exacto en todos los casos todavía no se conoce. En los últimos 10 años, se han identificado miles de proteínas acetiladas utilizando espectrometría de masa de alta resolución. Las proteínas encontradas, en distintos organismos, están involucradas en diversos procesos celulares: transcripción, reparación del ADN, remodelado de la cromatina, ciclo celular, “splicing”, distintas vías metabólicas, dinámica del citoesqueleto, apoptosis, transporte nuclear, plegado de proteínas, señalización celular, entre otros (Kim et al., 2006, Yu et al., 2008, Zhang et al., 2009, Choudhary et al., 2009, Wang et al., 2010b, Zhao et al., 2010, Weinert et al., 2011, Finkemeier et al., 2011, Jeffers & Sullivan Jr., 2012, Miao et al., 2013, Xie et al., 2014). Se ha postulado que el tamaño del “acetiloma” sería comparable al del “fosfoproteoma” aunque aún no se han encontrado cascadas de acetilación como ocurre con la fosforilación. Algunas acetiltransferasas y desacetilasas son capaces de auto-acetilarse pero no pueden catalizar la transferencia de grupos acetilo desde una proteína a otra. Además, el número de acetiltransferasas y desacetilasas en eucariotas es mucho menor que el número de quinasas y fosfatasa lo que sugiere que la regulación por acetilación es mucho más global que la regulación por fosforilación (Kouzarides, 2000).

ACETILACIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS

Existe un gran número de proteínas acetiladas presentes en el citoplasma, lo cual enfatiza el papel preponderante que tiene esta MPT en la regulación de eventos citoplasmáticos. A continuación se detallan las funciones que cumplen algunas proteínas acetiladas en el citoplasma:

Regulación del citoesqueleto a través de la acetilación de filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Las tres isoformas de actina se encuentran acetiladas en mamíferos y la acetilación de la lisina 61 en gamma actina estabiliza las fibras de estrés de actina (Kim et al., 2006). Además, seis de los siete subunidades del complejo Arp2/3, que es importante para la nucleación de actina, se encuentran acetiladas (Choudhary et al., 2009). Por otro lado, la cortactina al ser acetilada se trasloca la periferia de la célula y su capacidad de unión a la actina se reduce, inhibiendo la migración celular (Zhang et al., 2007). La acetilación de α -tubulina en microtúbulos se correlaciona con la estabilidad de los mismos y se detallará más adelante (Perdiz et al., 2011). En cuanto a los filamentos intermedios, la vimentina y la citoqueratina-8 está acetiladas en varios residuos de lisina. En contraste a la tubulina y actina, la acetilación en este caso, parece desestabilizar el polímero (Drake et al., 2009).

Transporte celular a través de microtúbulos. Este mecanismo es especialmente importante en células que tienen extensiones largas como axones y dendritas de neuronas. Las kinesinas están involucradas en el transporte anterógrado a través de microtúbulos, mientras que las dineínas en el transporte retrógrado de materiales celulares. La unión de la kinesina-1 así como su movilidad sobre los microtúbulos se ve aumentada por la acetilación de α -tubulina (Reed et al., 2006). Además, varias proteínas motoras se encuentran acetiladas pero su función en el transporte todavía no se conoce (Choudhary et al., 2009).

Chaperonas, formación de gránulos de estrés y autofagia. Las proteínas de shock térmico (Hsp) están acetiladas en varios residuos de lisina y su estado de activación depende de su grado de acetilación (Bali et al., 2005). Además, la Desacetilasa 6 (HDAC6) es esencial para la formación de gránulos de estrés y para la constitución de lisosomas. HDAC6 tiene la capacidad de unirse a proteínas poli-ubiquitinadas y a motores de dineína, los cuales transportan a las proteínas mal plagadas a los agregosomas (Kawaguchi et al., 2003).

Transporte núcleo-citoplasma. La mayoría de las proteínas que se mueven entre el núcleo y citoplasma son acetiladas por las acetiltransferasas p300/CBP y PCAF. Todavía no se conocen reglas generales para la localización diferencial de proteínas acetiladas, en algunos casos se potencia la localización citoplasmática y en otros casos la nuclear (Revisado por Sadoul et al., 2011).

Metabolismo energético. Se ha reportado que cambios en el estado de acetilación altera la actividad de distintas enzimas tanto en bacterias como en mamíferos y permite que la célula se adapte a las demandas metabólicas. Por ejemplo, en mamíferos la presencia de ácidos

grasos lleva a un aumento en la acetilación de enzimas de la β -oxidación como enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA hidrogenasa, lo que disminuye su actividad enzimática (Zhao et al., 2010). En *Salmonella enterica*, los niveles de acetilación de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) son mayores en células creciendo con glucosa que en células creciendo con acetato. Este aumento de acetilación lleva a un aumento en la actividad glicolítica y una disminución en la gluconeogénesis. Entonces, los niveles de acetilación de GAPDH controlarían el flujo de carbono en este organismo (Wang et al., 2010).

Como se observa a través de estos ejemplos, la acetilación de lisinas cumple diversos roles regulatorios dentro de la célula. A continuación se describirán a las enzimas responsables de acetilar/desacetilar distintos sustratos.

1.3.2 ACETILTRANSFERASAS Y DESACETILASAS

La acetilación de lisinas (K) es catalizada por acetiltransferasas que transfieren el grupo acetilo del acetil-CoA al grupo ϵ -amino de un residuo interno de lisina en una proteína. La reacción reversa es catalizada por desacetilasas. En cuanto a su nomenclatura, inicialmente fueron nombradas Histona acetiltransferasa y desacetilasa (HAT y HDAC) por su capacidad de modificar histonas. Luego, al descubrir que sus sustratos se extendían más allá de la cromatina se propuso nombrarlas Lisina acetiltransferasas y desacetilasas (KAT y KDAC) (Allis et al., 2007).

La primera Histona acetiltransferasa fue aislada hace veinte años del ciliado *Tetrahymena thermophila*, esta proteína es ortóloga al adaptador transcripcional de levadura Gcn5 (ahora llamada KAT2). Además, en la misma época se identificó a HAT1 en levaduras (KAT1), que inicialmente se postuló como una acetiltransferasa citoplasmática si bien luego se determinó que también cumplía funciones nucleares. En cuanto a las histonas desacetilasas (HDACs), la primera que se caracterizó era altamente homóloga al represor transcripcional Rpd3, conservado desde levaduras hasta humanos. El hecho de que los factores de transcripción tengan actividades acetiltransferasa y desacetilasa ayudó a establecer la conexión entre la acetilación de histonas y la transcripción. En líneas generales, la actividad de HATs y HDACs se correlacionan con la activación génica y la represión/silenciamiento génico, respectivamente. También existe una correlación entre la actividad aberrante de estas enzimas y enfermedades como cáncer y desordenes metabólicos. Hasta el momento, las HATs y HDACs son las enzimas modificadoras de histonas mejor caracterizadas bioquímicamente y estructuralmente (Revisado por Yuan & Marmorstein, 2013).

LISINA ACETILTRANSFERASAS

Las KATs están conservadas evolutivamente desde levaduras a humanos y algunas poseen dominios de unión a acetil-CoA y bromodominios. En general forman parte de complejos multiproteicos (Mujtaba et al., 2007). Estas enzimas son diversas en estructura, especificidad de sustrato y función, y en consecuencia su clasificación no es tan clara como la de las desacetilasas que detallaremos más adelante. El número de acetiltransferasas en el genoma humano no se conoce con exactitud debido a la baja similitud de secuencias entre estas enzimas, pero pueden clasificarse en al menos cinco familias, basadas en la divergencia de secuencia dentro del dominio HAT. Estas familias se nombran a partir de su miembro fundador:

- Tipo HAT1 (actualmente KAT1).
- Tipo Gcn5/PCAF o KAT2 (por Gcn5 de levaduras y su ortólogo en humanos PCAF).
- Tipo MYST (por MOZ humano (KAT6A), Ybf2/Sas3 de levaduras (KAT6), Sas2 de levadura (KAT8) and Tip60 humana (KAT5)).
- Tipo p300/CBP (por los parálogos humanos p300 (KAT3B) y hCBP (KAT3A)).
- Tipo Rtt109 (KAT11).

Mientras que las familias HAT1, Gcn5/PCAF y MYST tienen homólogos desde levaduras hasta humanos, la familia p300/CBP es específica de metazoos y la Rtt109 es específica de hongos. Se ha determinado que la estructura del dominio acetiltransferasa se encuentra conservado en todas las familias pero que cada una tiene diferentes mecanismos de catálisis a la hora de transferir el grupo acetilo a un residuo de lisina (Yuan & Marmorstein, 2013).

Los tripanosomátidos presentan secuencias en su genoma que codifican para unas pocas acetiltransferasas, metiltransferasas y módulos de unión (como bromodominios) comparado con otros eucariotas. En particular, hay ocho secuencias codificantes para acetiltransferasas que son muy divergentes de las de levadura o mamíferos y no contienen ningún dominio de unión reconocible. Cuatro de ellas están relacionadas a la familia MYST y tres a la familia Gcn5/PCAF (Ivens et al., 2005). En la tabla I se resumen las acetiltransferasas de tripanosomátidos y sus funciones reportadas. Hasta el momento solo se ha reportado una acetiltransferasa citoplasmática en *T. cruzi*. La misma pertenece al tipo Gcn5 y es capaz de autoacetilarse aunque no se conoce aún su sustrato (Ochaya et al., 2007).

Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de proteínas no nucleares en *Trypanosoma cruzi*

KAT	<i>T. brucei</i>	<i>L. major</i>	<i>T. cruzi</i>	Tipo	Localización	Funciones
HAT1	Tb927.7.4560	LmjF14.0140	TcCLB.506605.160 TcCLB.511239.150	MYST	Nuclear (<i>T. brucei</i> y <i>L. donovani</i>).	Esencial para el crecimiento. Requerida para el silenciamiento telomérico (<i>T. brucei</i>). Acetila H4K10 y su actividad es regulada por fosforilación (<i>Leishmania</i>).
HAT2	Tb11.01.3380	LmjF28.2270	TcCLB.511047.69 TcCLB.509203.60	MYST	Nuclear (<i>T. brucei</i>).	Esencial para el crecimiento. Responsable de la acetilación de H4K10.
HAT3	Tb927.10.8310	LmjF36.6990	TcCLB.507611.290 TcCLB.507723.110	MYST	Nuclear (<i>T. brucei</i>).	No es esencial para el crecimiento. Responsable de la acetilación de H4K4.
HAT4		LmjF13.0170	TcCLB.506227.160 TcCLB.450489.10	MYST	Citoplasmática en todos los estadios, nuclear en células post-mitóticas (<i>L. donovani</i>)	Acetila Histona H4.
Gcn5-like			TcCLB.511881.10 TcCLB.509453.30	Gcn5/PCAF		
AT1	Tb927.7.2360	LmjF.22.0450	TcCLB.511811.30 TcCLB.51809.120	Gcn5/PCAF	Citoplasmática en epimastigotes (<i>T. cruzi</i>)	Es capaz de autoacetilarse. No se conoce su sustrato.
ELP3a	Tb927.8.5770	LmjF16.0240	TcCLB.506743.120 TcCLB.503851.10	Gcn5/PCAF	Periferia nuclear (<i>T. brucei</i>)	
ELP3b	Tb927.8.3310	LmjF23.1350	TcCLB.509769.110	Gcn5/PCAF	Nucleolar (<i>T. brucei</i>)	Controla la transcripción del ADN ribosomal.

Tabla I: Acetiltransferasas de tripanosomátidos (Kumar et al., 2012, Siegel et al., 2008, Kawahara et al., 2008, Maity & Saha, 2012, Ochaya et al., 2007). En las columnas bajo *T. brucei*, *L. Mayor* y *T. cruzi* se indican los números de acceso de la base de datos TriTrypDB.

LISINA DESACETILASAS

Las KDAC pueden dividirse en dos familias, la clásica o zinc-dependiente y la NAD⁺ dependiente. Otra clasificación divide a estas enzimas en cuatro clases según su conservación filogenética. Las de clase I, II y IV corresponden a la familia clásica mientras que las clase III corresponden a las desacetilasas NAD⁺ dependientes, también llamadas Sirtuinas por su homología con la proteína Sir2 de levadura. Las desacetilasas clase I y II están representadas por las proteínas de levaduras Rpd3 y Hda1 respectivamente. Los miembros de estas clases tienen funciones solapadas pero distinguibles y están presentes desde bacterias hasta mamíferos. En humanos hay cuatro HDACs de clase I, seis de clase II, una de clase IV y siete de clase III (Yang & Seto, 2008, Brachmann et al., 1995). Existen HDAC nucleares y citoplasmáticas pero solo las Sirtuinas están presentes en la mitocondria. Si bien es esperable, aún no está claro si los miembros de las diferentes clases tienen preferencias por lisinas acetiladas particulares. En este sentido, se postula que la selectividad estaría dada por el reconocimiento del entorno en que se encuentra la lisina. Se ha observado que el contexto del residuo acetilado en proteínas citoplasmáticas es diferente al de histonas, pero similar al de otras proteínas nucleares que se acetilan. Además, los motivos de acetilación mitocondriales difieren de los encontrados en histonas y otras proteínas nucleares/citoplasmáticas (Kim et al., 2006, Choudhary et al., 2009). Sin embargo, a pesar de estos avances, la determinación de una secuencia consenso precisa para la

especificidad de sustrato de las diferentes KDACs (y también KATs) todavía no ha sido definida. En tripanosomátidos existen secuencias codificantes para desacetilasas clase I, II y III. En la tabla II se resumen sus funciones conocidas.

KDAC	<i>T. brucei</i>	<i>L. major</i>	<i>T. cruzi</i>	Clase	Localización	Función
DAC1	Tb10.70.6220	LmjF21.0680	TcCLB.511911.159 TcCLB.508637.114	I	Predominantemente nucleares en estadio sanguíneo y citoplasmática en el insecto vector (<i>T. brucei</i>)	Antagoniza con el silenciamiento telomérico dependiente de SIR2RP1. Esencial para la viabilidad.
DAC2	Tb11.01.7240		TcCLB.504159.80 TcCLB.506821.140	I	Citoplasmática (<i>T. brucei</i>)	No es esencial para la viabilidad.
DAC3	Tb927.2.2190	LmjF21.1870	TcCLB.509395.120 TcCLB.503653.50	II	Nuclear en todos los estadios del ciclo de vida (<i>T. brucei</i>)	Requerida para el silenciamiento de los promotores de los sitios de expresión de las VSGs en el estadio sanguíneo y en el vector. Esencial para la viabilidad.
DAC4	Tb927.5.2900	LmjF08.1090	TcCLB.507063.270	II	Citoplasmática (<i>T. brucei</i>)	No es esencial.
SIR2RP1	Tb927.7.1690	LmjF26.0210	TcCLB.507519.60 TcCLB.508207.150	III	Citoplasmática en promastigotes y amastigote (<i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> y <i>L. infantum</i>) Citoplasmática en todos los estadios del ciclo de vida (<i>T. cruzi</i>)	Desacetila α -tubulina y está parcialmente asociada a la red de microtúbulos.
SIR2RP2	Tb927.8.3140	LmjF23.1210		III	Nuclear en todos los estadios del ciclo de vida (<i>T. brucei</i>) Mitocondrial (<i>T. brucei</i>)	Cataliza la ADP-ribosilación y desacetilación de histonas. Involucrada en la reparación del ADN.
SIR2RP3	Tb927.4.2520	LmjF34.2140	TcCLB.447255.20 TcCLB.506559.80	III	Mitocondrial (<i>T. brucei</i>) Mitocondrial en todos los estadios del ciclo de vida (<i>T. cruzi</i>)	

Tabla II: Desacetilasas de Trypanosomatidos (Sereno et al., 2006, Garcia-Salcedo et al., 2003, Ingram & Horn, 2002, Wang et al., 2010a, Ritagliati et al, enviado). En las columnas bajo *T. brucei*, *L. Mayor* y *T. cruzi* si indican los números de acceso de la base de datos TriTrypDB.

1.3.3 ACETILACIÓN Y DINÁMICA DEL CITOESQUELETO

La acetilación es fundamental para regular la dinámica del citoesqueleto. Si bien la tubulina fue la primera proteína citoplasmática acetilada descrita, la función de esta modificación en la dinámica del citoesqueleto solo ha sido parcialmente comprendida recientemente.

Los microtúbulos son filamentos del citoesqueleto polares que están formados por heterodímeros de tubulina α/β que se asocian cabeza-cola y lateralmente. Estos polímeros dinámicos son esenciales para la morfogénesis, la división celular y el transporte intracelular. La mayoría de los microtúbulos forman túbulos individuales, por ejemplo, los que están presentes en el huso mitótico. Otro sub-grupo forma estructuras más complejas formadas por un microtúbulos completo (túbulo A) fusionado a uno o dos túbulos incompletos (túbulo B y C). Un ejemplo de estas formas son el axonema ciliar (dobletes de microtúbulos) o los centriolos y cuerpo basal (tripleto de microtúbulos).

La diversidad de función de los microtúbulos observada en las células está dada por reguladores que actúan sobre ellos así como por la variedad genética y química de la tubulina. En muchos eucariotas, tanto la α - como la β -tubulina están codificadas por familias multigénicas y la mayoría de los microtúbulos están formados por una mezcla de isotipos pero en general, contienen uno que predomina. Además, los diferentes isotipos tienen funciones específicas y no siempre son intercambiables. Por otro lado, otra fuente de diversidad son las modificaciones post-traduccionales. Tanto los dímeros de tubulinas como los microtúbulos pueden adquirir modificaciones post-traduccionales reguladas y evolutivamente conservadas. Estas incluyen, adición y remoción de tirosinas en el extremo C-terminal, remoción no reversible del penúltimo residuo de glutamato, acetilación de la lisina 40 de la α -tubulina, poli-glutamilación o poli-glicilación de α - y β -tubulina, fosforilación de β -tubulina y palmitoilación de α -tubulina. Recientemente también se reportó la acetilación de tubulina β (Figura 11).

La acetilación de α -tubulina es una de las primeras modificaciones de esta proteína descubiertas. Inicialmente se asoció con la estabilidad de los microtúbulos pero ahora se sabe que la acetilación es una consecuencia de la estabilización y no la causa. A diferencia de lo que ocurre con otras modificaciones post-traduccionales que decoran las colas C-terminales que protruyen de los microtúbulos, la lisina 40 que se acetila se encuentra en un bucle desordenado que se ubica dentro del lumen de los microtúbulos. La disposición exacta del bucle de acetilación no está clara pero es probable que se pueda reorganizar de manera de presentar la lisina hacia fuera para que pueda ser modificada. Otra alternativa es que, como el bucle de acetilación esté cerca de la interfase entre dos protofilamentos, esta modificación pueda afectar el empaquetamiento de los heterodímeros y en consecuencia afectar la dinámica o conformación de los sitios de unión de otras proteínas a los microtúbulos (Perdiz et al., 2011).

En cuanto a las enzimas responsables de la acetilación y desacetilación de tubulina, se han reportado dos lisina acetiltransferasas con esta actividad. Una de ellas, denominada MEC17/ α TAT en *C. elegans*, pertenece a la familia Gcn5 y tiene homólogos en distintas especies. MEC17/ α TAT recombinante es capaz de acetilar α -tubulina *in vitro* exclusivamente en la lisina 40 (Akella et al., 2010). Recientemente, ensayos *in vitro* con la α TAT humana indican que esta enzima tiene preferencia por microtúbulos sobre dímeros de tubulina. Además, ingresaría a los microtúbulos desde los extremos difundiendo hacia el lumen y tiene una baja tasa de catálisis en relación con la tasa de difusión dentro del microtúbulo, lo que explicaría por qué solo los microtúbulos largos y estables son modificados (Szyk et al., 2014).

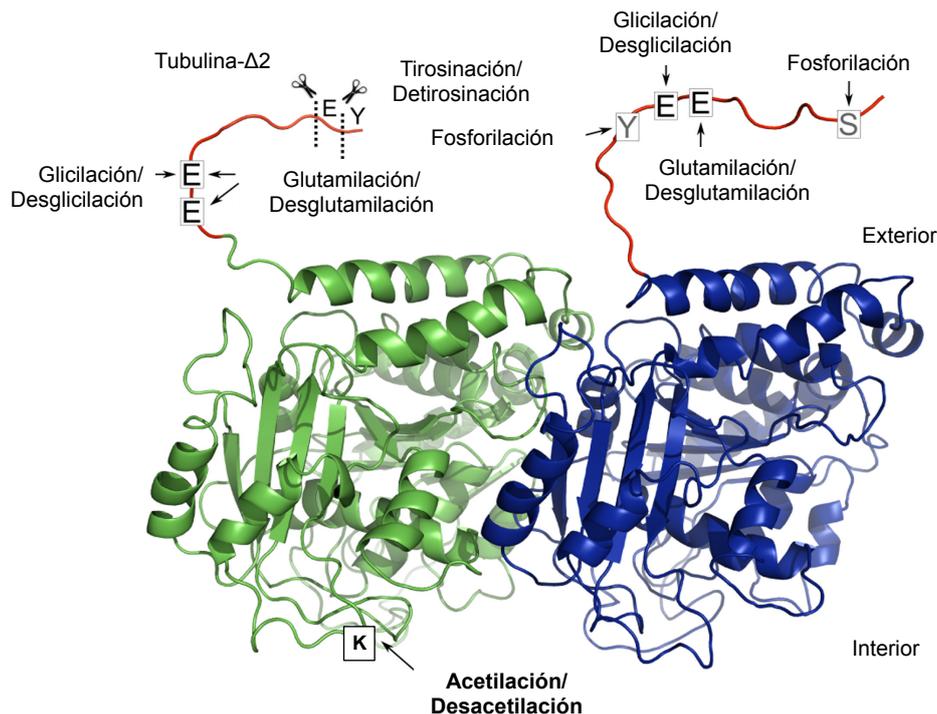


Figura 11: Representación de un heterodímero de tubulina (α -tubulina en verde y β -tubulina en azul). Se representan las colas C-terminales desestructuradas en rojo. Se indican las modificaciones post-traduccionales conocidas. Los residuos en gris están conservados solo en un grupo de isoformas de tubulina. E, ácido glutámico; Y, tirosina; S, serina; K, lisina. Se indican también los sitios de corte (tijeras) que generan el isotipo de tubulina $\Delta 2$. Adaptado de Garnham y Roll-Mecak, 2012.

La otra enzima que presenta actividad acetiltransferasa de tubulina es la subunidad Elp3 del complejo Elongador que se ha descrito en humanos, ratones y nematodos. Este complejo está formado por seis subunidades (Elp1-6) y tiene funciones tanto en el núcleo como en el citoplasma. Elp3 tiene un dominio acetiltransferasa de tipo Gcn5 y acetila tanto histonas como α -tubulina (Singh et al., 2010, Barton et al., 2009, Solinger et al., 2010). Como se mencionó anteriormente, la acetilación de tubulina es reversible y hay al menos dos enzimas capaces de desacetilar esta proteína reportadas: HDAC6 y SIRT2. Ambas co-localizan con microtúbulos y pueden desacetilar tubulina tanto *in vivo* como *in vitro*. HDAC6 es una desacetilasa exclusivamente citoplasmática que modifica α -tubulina, se asocia con los microtúbulos y regula la motilidad celular (Hubbert et al., 2002). Por otro lado, SIRT2 es una desacetilasa NAD⁺-dependiente predominantemente citoplasmática, que colocaliza e interacciona con HDAC6 en levaduras y humanos (North et al., 2003).

El rol exacto de la acetilación de tubulina en las funciones celulares aún no se ha descrito con precisión. Se sabe que mutantes con tubulina no acetilable en *T. thermophila* no producen anomalías morfológicas ni presentan defectos en el crecimiento (Gaertig et al., 1995). El mismo resultado se obtuvo utilizando células que no expresaban MEC17/ α TAT

(Shida et al., 2010). Contrariamente, peces cebra que no expresan *mec17* sí muestran defectos anatómicos groseros y defectos neuromusculares (Akella et al., 2010). En conclusión, todavía no está claro cual es el mecanismo responsable de estos fenotipos y si están relacionados con defectos en el ensamblado de cilios observado en células aisladas.

ACETILACIÓN DE TUBULINA EN TRIPANOSOMÁTIDOS

En tripanosomátidos, la composición de las isoformas de tubulina está dada por una transcripción diferencial de los genes de tubulina y también por distintas modificaciones post-traduccionales. Una de las isoformas más abundantes es la α -tubulina acetilada que esta presente en diferentes estructuras microtubulares de estos protozoos. Los microtúbulos subpeliculares están formados por α -tubulina acetilada en mayor proporción y sin modificar en menor proporción. Por otro lado, el axonema flagelar y el huso mitótico se encuentra casi completamente compuesto por la isoforma acetilada. Estos patrones se mantienen en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. brucei* (Schneider et al., 1987) y *T. cruzi* (Souto-Padron et al., 1993). En *Leishmania infantum* se ha reportado la presencia de una desacetilasa NAD⁺ dependiente (*LiSIR2RP1*) que es capaz de modificar α -tubulina, colocaliza parcialmente con el citoesqueleto y posee actividad ADP-ribosil transferasa (Tavares et al., 2008). Además, existen en el genoma de TriTryps secuencias codificantes homólogas a la acetiltransferasa de tubulina α TAT aunque aún no han sido caracterizadas.

Como podemos ver la información sobre el rol de la acetilación de tubulina en tripanosomátidos es escaso, contándose con menos información que para otros eucariotas. Pero los patrones extensos de acetilación son específicos de tripanosomátidos y hacen a estos organismos buenos modelos para el estudio de los mecanismos de modificación de α -tubulina y su influencia en el rol funcional de los microtúbulos tanto en la división celular como en la diferenciación durante el ciclo de vida.

1.4 BROMODOMINIOS

El bromodominio (BRD) fue reportado por primera vez en la proteína Brahma de *Drosophila* y representa una extensa familia de módulos proteicos evolutivamente conservados presente en proteínas asociadas a la cromatina y en la mayoría de las HATs. En un principio, a partir de estudios genéticos en levaduras, se asoció a este dominio con los mecanismos de remodelación de la cromatina y regulación de la transcripción. Pero su función específica empezó a ser comprendida al descubrirse que funcionaban como dominios de unión a lisinas acetiladas. Esto sugirió un nuevo mecanismo de regulación de las interacciones proteína-proteína a través de la acetilación de lisinas (Zeng & Zhou, 2002).

I.4.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Los bromodominios son los únicos módulos de interacción proteica que reconocen específicamente la ϵ -N-acetilación de los residuos de lisina. Todos los BRDs se pliegan en una estructura evolutivamente conservada de alrededor de 120 residuos con cuatro alfa-hélices. Aunque existe una gran variación a nivel de secuencias entre los bromodominios, todos comparten un plegamiento de cuatro alfa-hélices (α A, α B, α C y α Z) anti-paralelas unidas por dos bucles o “loops” de longitud variable (ZA-loop y BC-loop) (Figura 12A). La resolución de la estructura cristalográfica de proteínas con bromodominios junto con sus sustratos peptídicos permitió demostrar que los epítopes de acetil-lisina son reconocidos en una cavidad central profunda e hidrofóbica donde la Ac-K es anclada por puentes hidrógeno a una Asparagina (N156 en BRD2 humana) conservada presente en la mayoría de los BRDs (Figura 12B) (Umehara et al., 2010).

El análisis filogenético de las familias de BRDs fuera de los dos núcleos de alfa-hélices centrales es complicado debido a la baja homología de secuencia y a las inserciones no conservadas en las regiones de los bucles. Recientemente se consiguió clasificar los bromodominios humanos en ocho familias mediante alineamientos tridimensionales basados en estructura que incluyen estructuras obtenidas por RMN y predicciones *in silico* de estructuras secundarias (Filippakopoulos et al., 2012). En la figura 12C se observa el filograma que separa los BRDs humanos en ocho familias (I-VIII). Los miembros de cada familia y la presencia de similitudes funcionales entre los miembros de cada una se detallan a continuación.

FAMILIA I

Contiene acetiltransferasas (HATs) como PCAF, Gcn5L y también factores generales de la transcripción como FALZ y CECR2, que se localizan en el núcleo. Estas proteínas con bromodominios contribuyen a la acetilación específica de las histonas porque promueven el movimiento de HATs a sitios específicos en el cromosoma.

FAMILIA II

Está constituida por las proteínas BET (del inglés “Bromo and Extra Terminal domain”) que comparten una arquitectura característica compuesta por uno o dos bromodominios N-terminales en tándem que tienen un alto grado de conservación a nivel de secuencia. Además contienen un dominio extra-terminal (ET) y un dominio C-terminal más divergente. Hay cuatro proteínas en este grupo en mamíferos: BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT. El último miembro de esta familia solo se expresa en ovarios y testículos mientras que los otros tres

se expresan ubicuamente. Las proteínas BET son reclutadas a los sitios de inicio de la transcripción durante la mitosis y se unen a sitios acetilados adyacentes con alta afinidad.

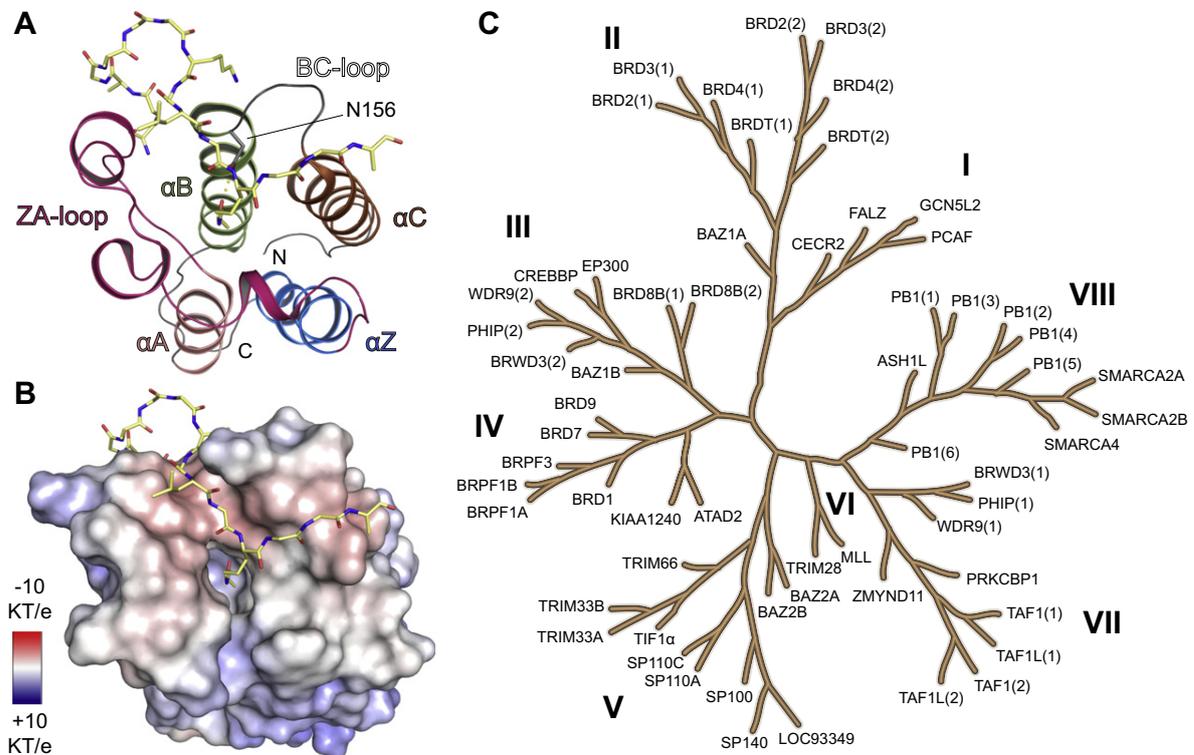


Figura 12: Plegamiento general del bromodominio, modo de unión al sustrato y filogenia. A- Estructura general del bromodominio. Están indicadas las regiones N-, C-terminal y su estructura secundaria (ID: 2DVQ, BRD2 humana). También se muestra la unión de un péptido de histona H4 acetilada en la lisina 12 (H41-15K12ac) en la cavidad central del módulo. B- Superficie del bromodominio de BRD2 (misma orientación que en A) coloreado de acuerdo a su potencial electrostático, lo que demuestra la superficie cargada alrededor de la cavidad de unión a la lisina acetilada. C- Árbol filogenético basado en estructuras de los bromodominios humanos. Las diferentes familias se denominan con números romanos (I-VIII). Adaptado de Filippakopoulos y Knapp, 2012.

FAMILIA III

Contiene a los reguladores transcripcionales BRD8B, CREBBP, EP300, WDR9, BAZ1B, WDR3 y PHIP.

FAMILIA IV

Contiene los reguladores transcripcionales BRD7, BRD1, BRPF1, ATAD2, KIAA1240, BRD9 y BRPF3. La unión a proteínas acetiladas por estos bromodominios no ha sido extensamente estudiada pero si se ha reportado su participación en distintas enfermedades.

FAMILIA V

Este grupo está conformado por los represores transcripcionales TRIM66, TRIM 33 y BAZ2A y por los reguladores transcripcionales TIF1 α , SP100, SP110, SP140 y BAZ2B. Su

característica principal es la presencia de un dominio PHD (del inglés “Plant Homeo Domain”) en tándem con el bromodominio, que parece ser un motivo estructural necesario para el reconocimiento del péptido acetilado así como para la estabilidad de la proteína.

FAMILIA VI

No se han reportado interacciones mediadas por acetil-lisina para estos bromodominios con histonas u otras proteínas acetiladas. Incluye la histona metil-transferasa MML y el co-regulador transcripcional TRIM28.

FAMILIA VII

Contiene al represor transcripcional ZMYND11, los iniciadores transcripcionales TAF1 y TAF1L y al dominio 1 de WDR9, BRWD3 y PHIP.

FAMILIA VIII

Esta compuesta por la metil-transferasa ASH1L y los factores remodeladores de la cromatina SMARCA2, SMARCA4 y PB1 (Filippakopoulos & Knapp, 2012).

Entre todas las familias los residuos importantes para el reconocimiento de la acetil-lisinas están muy conservados, por lo cual las diferencias en la selectividad del ligando pueden atribuirse a variaciones en el bucle ZA y diferencias en los aminoácidos que interactúan con los residuos que rodean a la acetil-lisina (Zeng & Zhou, 2002).

1.4.2 RECONOCIMIENTO DE LA ACETIL-LISINA

Dhalluin y colaboradores resolvieron la primera estructura tridimensional de un bromodominio usando RMN. La estructura fue la del factor asociado al co-activador transcripcional p300/CBP (PCAF) (Dhalluin et al., 1999). Como se explicó anteriormente, los BRDs comparten un plegamiento conservado de cuatro alfa-hélices anfipáticas con giro anti-paralelo, las cuales están unidas por dos bucles de secuencia variable que contribuyen a la especificidad de ligando. En un extremo, las regiones N- y C-terminales se acercan, mientras que en el extremo opuesto los bucles ZA y BC se empaquetan entre sí formando un bolsillo hidrofóbico que reconoce al ligando acetilado. Este grupo demostró que los grupos metil y metileno del ligando hacían contacto con las cadenas laterales de la valina 752, alanina 757, tirosina 760, tirosina 802, asparagina 803 y tirosina 809 de PCAF. Todos estos aminoácidos están altamente conservados entre los bromodominios (Figura 13, asteriscos).

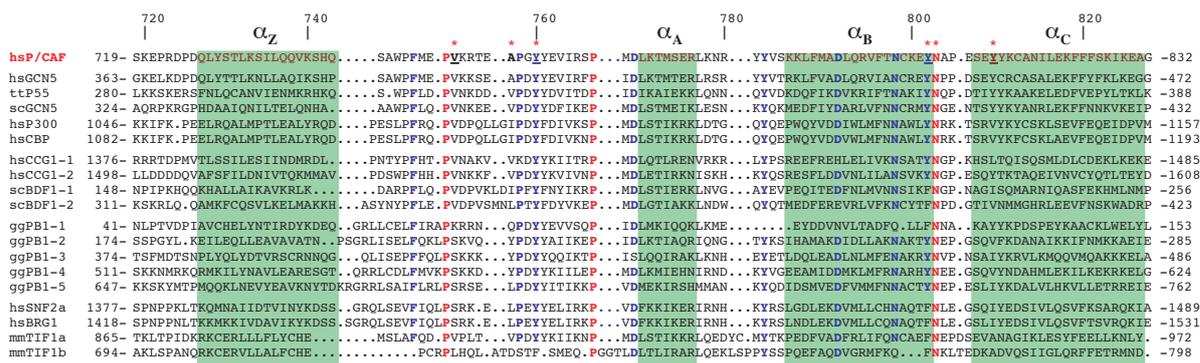
Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de proteínas no nucleares en *Trypanosoma cruzi*

Figura 13: Alineamiento de secuencias basado en estructura de bromodominios seleccionados. Las secuencias se alinearon en base a la estructura del bromodominio PCAF obtenida por RMN. Las alfa-hélices predichas se indican en verde. Sobre la secuencia de PCAF se indican los números de residuos. Tres residuos absolutamente conservados en PCAF se indican en rojo (Pro 751, Pro 767 y Asn 803). Residuos altamente conservados se indican en azul. Los asteriscos indican los residuos de PCAF que interactúan con el ligando utilizado, acetil-histamina, determinado por NOEs intramolecular. Los residuos subrayados fueron mutados a alanina por mutagénesis sitio-dirigida. Adaptado de Dhalluin et al, 1999.

En este trabajo también se realizó mutagénesis sitio-dirigida en la Y809, Y802, Y760 y V752 para determinar la contribución relativa de cada residuo en la unión bromodominio-acetil lisina (utilizando un péptido de histona H4 acetilado como ligando). La sustitución de la Y809 por alanina anuló completamente la unión mientras que al mutar los restantes aminoácidos se observó una reducción significativa de la afinidad bromodominio-ligando (tabla III). A partir de estos resultados, los autores concluyen que la tirosina 809 es esencial para la interacción del bromodominio con el grupo acetilo y que la tirosina 802, 760 y la valina 752 de PCAF probablemente tienen roles estructurales y funcionales en el reconocimiento de la acetil-lisina.

Mutantes PCAF	Integridad estructural del bromodominio (evaluado mediante espectros ¹⁵ N-HSQC)	Afinidad por el ligando (comparada con el Salvaje)
Salvaje	++++	
Y809A	++++	No hay unión
Y802A	+++	Reducción significativa
Y760A	+++	Reducción significativa
V752A	++	Reducción significativa

Tabla III: Análisis estructural y funcional de los mutantes del bromodominio de PCAF. +++, estable como el salvaje; +++, moderadamente destabilizado; ++, moderadamente desestabilizado.

Estos resultados fueron luego confirmados cuando se cristalizó el complejo GCN5-H4KAc16 (Filippakopoulos et al., 2010). En este reporte, se corroboró que la unión de la acetil-lisina al bromodominio se produce mediante los residuos aromáticos e hidrofóbicos conservados mencionados anteriormente y además se reportó que se forma una unión por puente

hidrógeno entre la acetil-lisina y la asparagina altamente conservada en todos los bromodominios que se mencionó anteriormente.

1.4.3 FUNCIONES REPORTADAS PARA BROMODOMINIOS

Es difícil predecir la función de proteínas con bromodominio basándose en la similitud de secuencias debido a su gran variabilidad, complejidad y a la influencia de dominios vecinos en su función. Además, muchos bromodominios no están caracterizados funcionalmente pero si han sido implicados en diversas enfermedades. La desregulación de la transcripción por patrones aberrantes de acetilación es un mecanismo muy estudiado en células cancerígenas y actualmente, se están probando inhibidores de HDACs contra esta enfermedad.

Los bromodominios están presentes en diversas proteínas nucleares como, HATs (GCN5, PCAF), complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (BAZ1B), helicasas (SMARCA), metiltransferasas (MLL, ASH1L), co-activadores transcripcionales (TRIM/TIF1, TAFs), mediadores transcripcionales (TAF1), proteínas de andamiaje nuclear (PB1) y en la actualidad se reconocen al menos cuatro roles específicos para las proteínas con bromodominio (Filippakopoulos et al., 2012).

Son importantes para la acetilación de la cromatina por HATs. Esta función, que fue la primera identificada, no deja de ser paradójica ya que el bromodominio uniría el producto de la reacción enzimática del complejo acetiltransferasa. Se ha propuesto que mediante esta función se induciría la hiperacetilación de zonas de nucleosomas con niveles basales de acetilación. Sin embargo, no se sabe aún cómo se induce la acetilación sobre nucleosomas que no poseen ningún grado de acetilación previa.

Participan en el ensamblado y remodelamiento de nucleosomas dependiente de acetilación. La subunidad ATPasa Swi2/Snf2, del complejo de remodelamiento de la cromatina SWI/SNF contiene un bromodominio. Este es importante para el reconocimiento del nucleosoma acetilado, sinérgicamente con el remodelamiento y la acetilación de la cromatina por Gcn5. En las levaduras, Sth1 (homólogo a Snf2) es la subunidad ATPasa de otro complejo de remodelamiento de la cromatina, llamado RSC. Este complejo contiene otras tres proteínas con bromodominio Rsc1, Rsc2 y Rsc4. Swi2/Snf2 y Sth1 se encuentran conservadas en organismos multicelulares como en la proteína Brahma de *Drosophila* y las proteínas Brm y BRG1 de mamíferos. En estos ortólogos de Swi2/Snf2 los bromodominios participarían en el reconocimiento de la cromatina acetilada. La presencia de este tipo de complejos con bromodominios indica una posible relación entre la acetilación de histonas y el ensamblado y remodelamiento de la cromatina dependiente de ATP.

Están involucrados en la organización de los cromosomas o dominios cromosomales.

Corresponde a actividades de ensamblado y remodelamiento de nucleosomas similares a los descritos en el párrafo anterior pero con un efecto más amplio. BDF1 y BDF2 son proteínas de levadura, miembros de la familia BET. BDF1 se une a la histona H4 acetilada estableciendo de esta manera una barrera física entre eucromatina y heterocromatina. En mamíferos, BRD2 reconoce la lisina 12 acetilada de la histona H4, asociándose preferencialmente a regiones acetiladas en los cromosomas durante la mitosis. BRD4/MCAP15 interacciona con cromatina acetilada durante la interfase y la mitosis.

Interaccionan con proteínas no histonas acetiladas. Algunos complejos HATs que contienen bromodominios interaccionan con proteínas acetiladas como p53, c-Myb17 y MyoD18. Otro ejemplo es el bromodominio de PCAF que reconoce la lisina 50 acetilada de la proteína Tat de VIH (virus de inmunodeficiencia adquirida) y el bromodominio de CBP que se une específicamente a la lisina 382 acetilada de p53 (Revisado por Yang, 2004).

Todas las funciones reportadas para proteínas que contienen bromodominios, en organismos distintos de *Trypanosoma cruzi*, ocurren dentro del compartimento nuclear. Teniendo en cuenta la abundancia de proteínas acetiladas fuera del núcleo, es probable que los bromodominios tengan roles regulatorios, dentro y fuera del núcleo, diferentes a los descritos hasta el momento.

1.4.4 INHIBIDORES DE BROMODOMINIOS

Inicialmente se pensaba que los BRDs, como mediadores de interacciones proteína-proteína, no eran buenos candidatos como blancos para el desarrollo de drogas. Esta idea fue refutada en 2005 por el grupo de Zhou, el cual realizó una búsqueda de inhibidores del bromodominio PCAF mediante ensayos basados en RMN (Zeng et al., 2005). Este trabajo validó la hipótesis de que el bolsillo de unión a acetil-lisina es sensible a la unión de pequeñas moléculas e identificó un compuesto (N1-aryl-propane-1,3-diamine) con acción inhibidora a concentraciones micromolares. Este compuesto no se unía al BRD de la proteína de unión a CREB (CBP, del inglés “CREB Binding Protein”) pero si al de PCAF, por lo tanto se concluyó que existe selectividad entre las familias de bromodominios. Luego, en 2006, se reportaron inhibidores de CBP descubiertos utilizando una librería de compuestos que presentaban un anillo aromático conectado a un grupo acetamida directamente o a través de una cadena de dos o tres carbonos. Se postuló en este trabajo que esta combinación imitaría la unión de la acetil-lisina al bolsillo hidrofóbico (Sachchidanand et al., 2006). Estos trabajos iniciales demostraron que era posible desarrollar inhibidores de BRDs que bloquearan el sitio de unión a la lisina-acetilada y que los mismos presentaban una actividad biológica relevante.

Más recientemente dos grupos, el Consorcio de Genómica Estructural (SGC) y GlaxoSmithKline (GSK), desarrollaron independientemente inhibidores de BRDs de la familia BET selectivos a concentraciones nanomolares (Filippakopoulos et al., 2010, Nicodeme et al., 2010). El SGC desarrolló el compuesto JQ1 usando como punto de partida tienodiazepinas (reportadas por Mitsubishi Pharmaceuticals como ligandos de proteínas BET). GSK desarrolló el inhibidor I-BET usando un ensayo fenotípico para identificar reguladores de la Apolipoproteína A-1. Ambos inhibidores se unen al bolsillo que aloja a la acetil-lisina y bloquea directamente su reconocimiento por el bromodominio. Estos compuestos imitan las interacciones hidrofóbicas y la unión por puente hidrógeno del ligando peptídico natural. En particular, I-BET presenta un anillo 1,2,4-metriazolyl y JQ1 un anillo triazol, ambos imitan características del péptido acetilado. La selectividad por los bromodominios de la familia BET está dada por los contactos adicionales fuera de la cavidad que aloja a la acetil-lisina aunque no se distinguen preferencias por miembros particulares dentro de la familia. Tanto JQ1 como I-BET muestran permeabilidad celular y tiene actividad *in vivo*.

La eficacia de estos inhibidores BET de primera generación disparó la búsqueda de nuevos compuestos que inhiban BRDs no-BET así como también compuestos que distingan entre los miembros de una misma familia. Hewings y colaboradores reportaron que los 3,5-dimetiloxazoles también son capaces de competir con la acetil-lisina por el bolsillo de unión (Hewings et al., 2011, Hewings et al., 2013). Estos compuestos muestran valores de CI_{50} por debajo de 5 μ M para BRD2 y BRD3 (familia BET) y una actividad moderada contra el BRD de CBP (no-BET). Chung y colaboradores identificaron familias de fenil-dimetil-isoxazoles con actividad inhibitora y a partir de estos compuestos, se obtuvieron una serie de sulfonamidas con actividad anti-inflamatoria en ensayos celulares (Bamborough et al., 2012, Chung et al., 2012). Otro grupo también reportó una serie de sulfonamidas derivadas de dihidroquinazolininas inhibitoras de bromodominios BET (Fish et al., 2012). Uno de ellos, denominado PFI-1 mostró selectividad para los BETs y una potente actividad *in vivo*, así como un efecto anti-proliferativo en células leucémicas (Picaud et al., 2013a).

Por otro lado, se han desarrollado péptidos cíclicos inhibidores de CBP con afinidades similares a las reportadas por Hewings (Gerona-Navarro et al., 2011). Muy recientemente, utilizando como punto de partida [1,2,4]triazolo[4,3-a]phthalazina, se desarrollaron los primeros inhibidores que actúan en concentraciones sub-micromolares contra BRDs no-BET (CECR2, BRD4-1, CBP, BRD9 y TAF1L-2) (Fedorov et al., 2014). Otro grupo demostró que es posible inhibir los bromodominios con bolsillos de unión a acetil-lisina pequeños como BAZ2B que carece del canal ZA y un surco adyacente al motivo WPF presentes

exclusivamente en los bromodominios de la familia BET (Ferguson et al., 2013). También se reportaron compuestos con quinolona isoxazoles (I-BET151) con buena biodisponibilidad y un efecto supresor de la inflamación de origen bacteriano (Seal et al., 2012). Recientemente se identificaron derivados de 1,5-naphtyridinas como inhibidores de la familia BET con buenas propiedades farmacocinéticas (Mirquet et al., 2014) y derivados de 2-thiazolidinonas inhiben a BRD4 (Zhao et al., 2013). También se han descrito inhibidores de BRD4 derivados de isoxazol azepinas con buena actividad inhibidora de BET oral e *in vitro* (Gehling et al., 2013). Por otro lado, se ha reportado una búsqueda virtual para identificar compuestos comerciales que imiten a la acetil-lisina junto con predicciones de modelos de unión. Con este enfoque logró identificar cuatro nuevas estructuras base con capacidad de inhibir a BRD4 (Vidler et al., 2013).

Una de las metas más difíciles es encontrar inhibidores selectivos que puedan distinguir entre el bromodominio 1 y 2 dentro de BRD4 (posee dos bromodominios en tándem como el resto de los miembros de la familia BET). Se reportó recientemente que compuestos basados en diazobenzenos, particularmente el MS436, muestra una selectividad diez veces mayor por el primer bromodominio sobre el segundo sugiriendo que sería posible inhibir bromodominios individuales dentro de la familia BET (Zhang et al., 2013a). Otro ejemplo de selectividad es el compuesto RVX-208, que se encuentra en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, que tiene una actividad selectiva sobre el segundo bromodominio de las proteínas BET (Picaud, et al., 2013b).

Otro grupo de compuestos descritos tienen la capacidad dual de inhibir quinasas y bromodominios BET. Por ejemplo, el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (Dinaciclib) que interacciona con el sitio de unión a acetil-lisina de BRDT (Martin et al., 2013) o los inhibidores de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) (Dittmann et al., 2014, Ciceri et al., 2014). Recientemente Atkinson y colaboradores desarrollaron el primer inhibidor dual que actúa sobre “borradores” y “lectores” del epigenoma. Es el caso de DUAL946 que puede modular la actividad de la histona desacetilasa 1 (HDAC1) y de bromodominios BET. Este compuesto actúa en concentraciones sub-micromolares y podría ser útil para estudiar posibles actividades celulares coordinadas entre HDAC y bromodominios BET que afecten la expresión génica en condiciones de salud y enfermedad (Atkinson et al., 2014).

Se puede concluir que el desarrollo de compuestos inhibidores de bromodominios es un campo muy activo, pero hasta el momento solo los inhibidores de la familia BET son altamente efectivos. La búsqueda de compuestos contra el resto de las familias de bromodominios humanos recién comienza. Se ha desarrollado un recurso que organiza toda esta información, denominado ChEpiMod (<http://chepimod.org/db/>) (Meslamani et al., 2014).

Esta base de datos tiene información sobre moduladores químicos de dominios “lectores” del epigenoma. Una búsqueda simple en esta base de datos muestra que hay 196 compuestos inhibidores que actúan sobre el primer bromodominio de BRD4 reportados, 119 compuestos que actúan sobre el segundo bromodominio de BRD4, 97 compuestos sobre CBP, 60 compuestos sobre PCAF/KAT2B, 26 compuestos sobre EP300 y 12 compuestos que actúan sobre BRD2.

Finalmente, es importante resaltar que los inhibidores de bromodominios son una herramienta muy útil para investigar la función de proteínas con bromodominios en otros sistemas. La cantidad de nuevas funciones descubiertas en los últimos tres años para proteínas de la familia BET, desde que los inhibidores están disponibles, ejemplifica el poder de estos moduladores como herramienta para comprender el modo de acción de los bromodominios.

1.4.5 ROL DE LOS BROMODOMINIOS EN LA ENFERMEDAD

Como se explicó anteriormente, la conservación filogenética de los bromodominios desde levaduras hasta humanos remarca la importancia del reconocimiento de la acetil-lisina en procesos biológicos fundamentales. Los inhibidores de bromodominios han sido evaluados para el tratamiento de diversas enfermedades como cáncer, VIH/SIDA, enfermedades cardiovasculares e inflamación. En distintos tipos de tumores, se observa que los inhibidores de la familia BET (JQ1, I-BET151, I-BET762) tienen efectos anti-proliferativos a través de la desregulación de la transcripción del gen *myc* y otros efectos independientes de esta vía. En cuanto a la participación de bromodominios en VIH/SIDA se observó que los inhibidores BET (JQ1, I-BET, MS417) son capaces de reactivar el virus que está latente. Este mismo efecto se da para otros virus como el de leucemia murina y el poliomavirus de células de Merkel (Revisado por Sanchez et al., 2014).

A continuación, se detallaran algunos ejemplos puntuales de los distintos roles encontrados para proteínas con bromodominios en mamíferos que remarcan su potencial uso para el tratamiento de diversas enfermedades.

BRDs EN INFLAMACIÓN

Las primeras evidencias sobre el rol de los bromodominios en linfocitos se obtuvieron utilizando ratones transgénicos que sobre-expresaban BRD2, los cuales desarrollaban linfomas de células B. Estos ensayos sugirieron que las proteínas BET tenían un papel fundamental en la expansión y mantenimiento de los linajes linfocíticos que median diversas enfermedades autoinmunes. Además, se observó que las variaciones en la función o expresión de BRD2 pueden contribuir en parte con el desarrollo de artritis reumatoidea.

Por otro lado, se describió que BRD4 regula genes dependientes del factor nuclear kappa B en respuesta a la activación del sistema inmune innato mediada por endotoxinas. Se reportó también que al utilizar inhibidores de bromodominios en macrófagos derivados de médula ósea de ratón, se inhibían diferencialmente genes inducidos por lipopolisacáridos (LPS). Las consecuencias fisiológicas de esta inhibición se evaluaron en ratones tratados con dosis letales de LPS en un modelo utilizado para estudiar sepsis en humanos. Tratando con el inhibidor I-BET antes y durante el tratamiento se observó que se suprimía la expresión de citoquinas en suero y que los ratones sobrevivían. Esta supervivencia también se observó en otros modelos de sepsis sugiriendo que los I-BET serían potenciales drogas terapéuticas anti-inflamatorias. Otros bromodominios no-BET también han sido relacionados con enfermedades inmunes, por ejemplo, se han encontrado variantes raras del bromodominio SP110 en células derivadas de leucemia mielocítica (Prinjha et al., 2012).

BRDs EN ONCOLOGÍA

Las proteínas con bromodominio, en especial las de la familia BET, son muy importantes para la división celular y tienen un rol central en la oncogénesis. La sobre-expresión de BRD2 en linfocitos produce linfomas de células B. En tumores de mama, la expresión de BRD4 se encuentra desregulada y además, se determinó que está involucrado en la generación de metástasis. También se asoció la translocación de genes de bromodominios con carcinomas raros pero muy agresivos y también con leucemias humanas agudas. Se está evaluando el tratamiento con inhibidores de bromodominios en varias de estas patologías, con resultados prometedores (Prinjha et al., 2012).

BRDs EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Se han descrito diversas proteínas con bromodominio involucradas en la modulación de la respuesta frente a infecciones virales y bacterianas. Los bromodominios están presentes en proteínas importantes para la regulación del ciclo de vida de agentes infecciosos como VIH, herpes y papilomavirus (Prinjha et al., 2012).

OBJETIVOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



II OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo es acrecentar el conocimiento acerca de los procesos de regulación y señalización celular mediados por acetilación en el parásito humano *Trypanosoma cruzi*, en particular procesos que ocurren fuera del compartimiento nuclear.

Los **objetivos particulares** son la caracterización del factor con bromodominio TcBDF3 y el análisis de sus posibles roles en la biología de *T. cruzi*, específicamente durante el proceso de metaciclogénesis e infección. Además, se plantea evaluar el efecto de inhibidores de bromodominios sobre *T. cruzi*.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *TcBDF3* EN *TRYPANOSOMA CRUZI*

Para comenzar con la caracterización de *TcBDF3* se analizó su secuencia codificante mediante métodos bioinformáticos. Luego, a partir de anticuerpos específicos obtenidos previamente, se determinó la localización subcelular de esta proteína utilizando diferentes enfoques metodológicos. Finalmente, se demostró que *TcBDF3* es capaz de interactuar con α -tubulina acetilada en el citoesqueleto y flagelo de *T. cruzi*.

III.1.1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE *TcBDF3*

Los genomas secuenciados y ensamblados de distintos tripanosomátidos se encuentran disponibles en la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). Una búsqueda de proteínas con bromodominios en esta base arroja como resultado la presencia de seis marcos abiertos de lectura que codifican para proteínas hipotéticas con uno o dos bromodominios en *Trypanosoma cruzi*. Cuatro de ellos fueron inicialmente nombrados como *TcBDF1*, *TcBDF2*, *TcBDF3* y *TcBDF4* cuando se publicó la primera versión del genoma de este organismo (Ivens et al., 2005). Tres de los marcos abiertos de lectura hallados (*TcBDF1*, *TcBDF2* y *TcBDF3*), codifican proteínas pequeñas (225 AA – 296 AA) con un alto puntaje para el dominio, y los dos restantes (*TcBDF4* y *TcBDF5*) codifican proteínas de tamaño mayor (679 AA y 710 AA respectivamente) con bromodominios más divergentes. El sexto marco abierto fue incorporado recientemente a la base de datos y codifica para una proteína pequeña (353 AA) con un bromodominio divergente en su extremo N-terminal. Durante la Tesis Doctoral de la Dra. Vanina Villanova se amplificaron las secuencias codificantes de *TcBDF1-3* y se clonaron en distintos vectores de expresión de bacterias y *T. cruzi*. Además, se optimizaron las condiciones de expresión de algunas de las proteínas recombinantes en *E. coli* y se obtuvieron anticuerpos específicos mediante inoculación de ratones y conejos. Estos protocolos, con algunas modificaciones, serán utilizados durante este trabajo para caracterizar a *TcBDF3*.

La secuencia codificante para *TcBDF3* tiene dos variantes haplotípicas casi idénticas en el genoma de *Trypanosoma cruzi* (TcCLB.510719.70 and TcCLB.509747.110) que codifican para una proteína de 224 aminoácidos con un peso molecular calculado de 24,7 kDa. Posee un bromodominio (PFAM: PF00439) en su extremo N-terminal, desde la Arginina 37 hasta la Leucina 141. La porción C-terminal de la secuencia no posee similitudes con otros dominios proteicos presentes en las bases de datos pero presenta regiones enriquecidas en aminoácidos ácidos (30% de Ac. Glutámico + Ac. Aspártico), básicos (37% Lisina +

Arginina) y Serina (14%). Estas secuencias altamente cargadas pero de baja complejidad en general están involucradas en interacciones proteína-proteína.

En los otros TriTryps también están presentes secuencias ortólogas a TcBDF3. La proteína de *T. brucei* (Tb927.11.10070) tiene una identidad de secuencia del 63% y una similitud del 75,9% con TcBDF3. La proteína de *Leishmania major* (LmjF.36.3360) tiene una identidad de secuencia del 42% y una similitud del 54,9%. Ninguno de los ortólogos a TcBDF3 presentes en otros tripanosomátidos ha sido caracterizado aún. Al comparar la secuencia de TcBDF3 con los otros bromodominios de *T. cruzi* y bromodominios de otros organismos vemos una baja similitud de secuencia, siempre restringida a la región del bromodominio. En la figura 14A se observa un alineamiento de las secuencias proteicas de la región del bromodominio de TcBDF1, 2 y 3 superpuesto con la predicción de estructura secundaria (sobre el alineamiento). La estructura secundaria de TcBDF3 fue modelada utilizando en servidor Phyre 2 (Figura 14B). Este servidor utiliza una librería de estructuras presente en la base de datos SCOP y PDB (Protein Data Bank) para predecir en base a homología/analogía la estructura secundaria de la secuencia incógnita. Se obtuvo el patrón característico de los bromodominios que consta de cuatro α -hélices conectados por dos bucles. Los aminoácidos importantes para la interacción con la lisina acetilada se encuentran dentro de los bucles que forman el bolsillo hidrofóbico, análogo a lo que ocurre con otros bromodominios que tienen sus estructuras cristalográficas resueltas. Además, se realizaron alineamientos de las secuencias proteicas de bromodominios de distintos organismos junto con TcBDF3 y pudimos ver que los aminoácidos involucrados en la unión del residuo de Lisina acetilado están conservados, lo que avala la funcionalidad del bromodominio de TcBDF3 (Figura 14C, asteriscos).

Por otro lado, la localización subcelular de TcBDF3 fue predicha utilizando diferentes servidores en línea. Los predictores pSORTII (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) y Wolf pSORT (<http://wolfpsort.org/>) asignaron mayor puntaje a una localización no-nuclear. Este resultado fue inesperado ya que como se mencionó en la introducción las proteínas con bromodominio descritas en la literatura presentan en su mayoría una localización nuclear y BDF2 de *Trypanosoma cruzi*, el único bromodominio caracterizado hasta el momento en este organismo, es una proteína nuclear en todos los estadios del ciclo de vida (Villanova et al., 2009). Además, utilizamos el servidor TFPP (del inglés “Tool for recognizing flagellar proteins in *Trypanosoma brucei*) que es un método computacional capaz de predecir localización flagelar en *T. brucei* (Zhang et al., 2013b). TFPP predijo una localización flagelar para TcBDF3 y para su ortólogo en *T. brucei*, pero no así para TcBDF2.

III.1.2 EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-*TcBDF3*

Para estudiar la expresión de *TcBDF3* en *Trypanosoma cruzi* se obtuvieron anticuerpos contra la proteína recombinante en conejo y ratón. Los mismos fueron purificados por cromatografía de afinidad y se utilizaron en ensayos de western blot e inmunofluorescencia en los distintos estadios del ciclo de vida del parásito.

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos obtenidos, se realizaron ensayos de western blot utilizando extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi* y *TcBDF3* recombinante (fusión a cola de histidinas) con anticuerpos obtenidos tanto en conejo (C) como en ratón (R). En todos los casos se observó una sola banda del peso molecular esperado para *TcBDF3* (Figura 15A). Luego, se evaluó la especificidad de los anticuerpos utilizando anticuerpos anti-*TcBDF3* previamente incubados con *TcBDF3* recombinante en ensayos de western blot (Figura 15B).

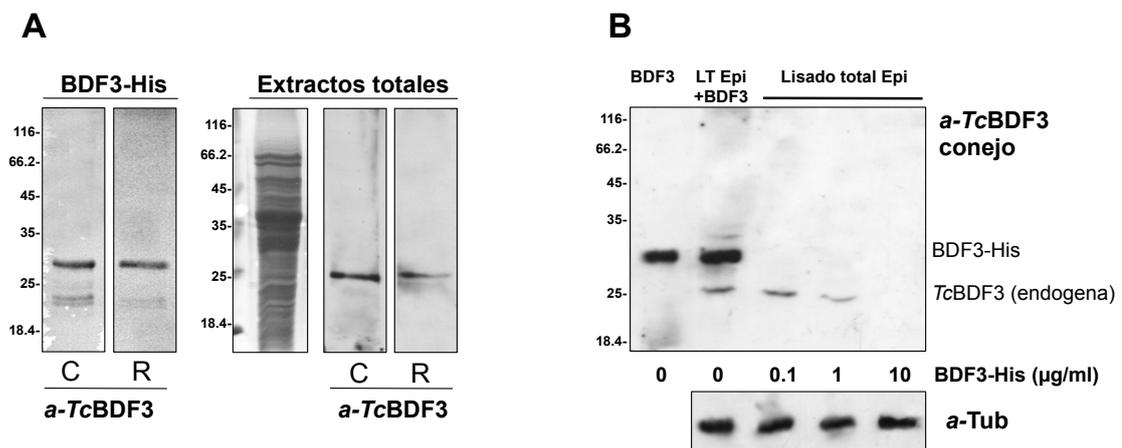


Figura 15: Los anticuerpos anti-*TcBDF3* obtenidos en conejo y ratón son específicos. A- Ensayos de western blot con anticuerpos anti-*TcBDF3* (a-*TcBDF3*) de conejo (C) y ratón (R) contra extractos totales de epimastigotes de *T. cruzi* y *TcBDF3* recombinante (*TcBDF3*-his). B- Ensayos de western blot con anti-*TcBDF3* de conejo “competidos” con *TcBDF3* recombinante en extractos totales de epimastigotes (Lisado total Epi) y extractos totales suplementados con *TcBDF3*-his (LT Epi+BDF3). Como control de carga se utilizaron anticuerpos anti-tubulina (a-Tub). Los anticuerpos fueron incubados previamente con cantidades crecientes de *TcBDF3* recombinante (μg/ml).

Pudimos observar como la señal desaparecía al “competir” los anticuerpos con proteína recombinante, lo que corrobora la especificidad de los mismos. La reactividad cruzada de los anticuerpos anti-*TcBDF3* con los otros bromodominios también fue descartada mediante ensayos de western blot con *TcBDF1* y *2* recombinantes (Tesis Doctoral, Dra. Vanina Villanova).

III.1.3 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE TcBDF3 EN EPIMASTIGOTES

Con los anticuerpos anti-TcBDF3 purificados evaluamos la localización de TcBDF3 en extractos nucleares y no nucleares (que corresponde a la fracción citoplasmática y de membrana) de epimastigotes de *T. cruzi*. Observamos mediante ensayos de western blot una sola banda inmunoreactiva, únicamente en las fracciones no nucleares. Como controles de la preparación de los extractos utilizamos anticuerpos contra las proteínas nucleares TcHMGB (Cribb et al., 2011), TcBDF2 (Villanova et al., 2009) e Histona H4 (da Cunha et al., 2006) de *T. cruzi* y anti-tirosin amino transferasa (TAT) (Marciano et al., 2009) que es una proteína citosólica (Figura 16A).

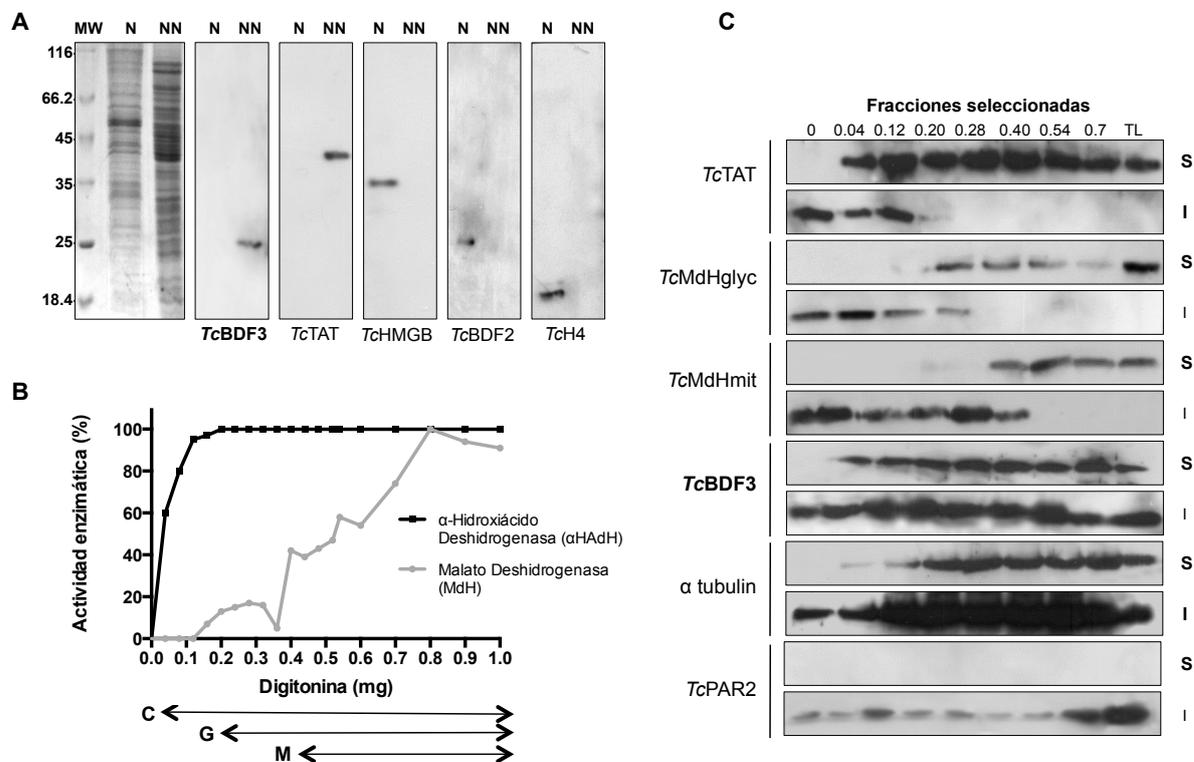


Figura 16: TcBDF3 es una proteína con bromodominio citoplasmática en epimastigotes. A- Ensayos de western blot en extractos nucleares (N) y no-nucleares (NN) de epimastigotes de *T. cruzi* utilizando anticuerpos anti-TcBDF3, anti-TcTAT (citosólica), anti-TcHMGB, anti-TcBDF2 y anti-Histona H4 (nucleares). A la izquierda se muestra el SDS-PAGE de los extractos utilizados teñidos con Azul de Coomassie. B- Gráfico de la actividad enzimática de aHADH y MdH medida en epimastigotes tratados con distintas concentraciones de digitonina (0 a 1 mg). Las flechas debajo de gráfico indican las concentraciones a las que comienza a liberarse el contenido citosólico (C), glicosomal (G) o mitocondrial (M). C- Western blot de fracciones obtenidas a distintas concentraciones de digitonina. Se seleccionaron volúmenes iguales de fracciones solubles (S) e insolubles (I). Se utilizaron anticuerpos anti-TcBDF3, anti-TcTAT (citosólica), anti-TcMDHglic (glicosomal), anti-TcMdHmit (mitocondrial), anti-TcPAR2 (vara para-flagelar) y anti- α tubulina (citoesqueleto). TL, lisado total.

Como se explicó anteriormente, el bromodominio es un dominio proteico conservado presente en diversos eucariotas y es el único módulo capaz de unir residuos de lisina acetilados (Mujtaba et al., 2007, Sanchez & Zhou, 2009). La acetilación es una modificación post-traducciona muy abundante y, en consecuencia, las proteínas capaces de “leer” esta marca tienen diversas funciones. Los bromodominios están presentes en histona acetiltransferasas, histona metiltransferasas, histona kinasas, co-activadores transcripcionales, co-represores transcripcionales, ubiquitin-ligasas y remodeladores de la cromatina. Como podemos ver, todas estas proteínas cumplen funciones diversas pero siempre involucradas en procesos nucleares. Solo se ha reportado la presencia de bromodominios fuera del núcleo en el caso particular de BRD2 de ratón. Esta proteína se localiza en el núcleo de células del sistema nervioso que están proliferando, mientras que en neuronas diferenciadas su localización es citoplasmática. Hasta el momento, su función fuera del núcleo (si la hubiere) es desconocida (Crowley et al., 2004). También, esta proteína se encuentra en el citoplasma de células epiteliales mamarias arrestadas en G₀ durante la lactancia en el ratón. Luego de este período BRD2 se relocaliza en el núcleo donde se postula que podría estar activando la apoptosis de estas células (Crowley et al., 2002). Estos cambios de localización observados parecen correlacionarse con la progresión a través del ciclo celular en tejidos específicos pero la función exacta de los bromodominios en el citoplasma es incierta. La presencia de TcBDF3 fuera del núcleo en epimastigotes fue un hallazgo curioso que nos llevó a pensar en la posibilidad de un nuevo mecanismo de regulación dependiente de acetilación no reportado hasta el momento.

A continuación, decidimos utilizar diferentes enfoques para determinar la localización subcelular de TcBDF3 en epimastigotes. En primer lugar se realizó un fraccionamiento subcelular con digitonina. La digitonina es un glicósido que disuelve lípidos, especialmente en membranas, y este método de fraccionamiento se basa en la diferencia en el contenido de esteroides de las distintas membranas celulares. Las membranas celulares con alto contenido de esteroides, como la membrana plasmática, son permeabilizadas a bajas concentraciones de digitonina. En cambio membranas con bajo contenido de esteroides, como la mitocondrial y glicosomal, son permeabilizadas a altas concentraciones del detergente. Para determinar en que fracciones comenzaban a liberarse las proteínas citosólicas medimos la actividad de la enzima alfa-hidroxiácido deshidrogenasa (α HAdH) espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de NADH a 339 nm. El contenido citosólico empezó a ser liberado a partir de los 0.04 mg de digitonina. Por otro lado, midiendo la actividad enzimática de la malato deshidrogenasa (Mdh), la cual presente una isoforma glicosomal y otra mitocondrial, determinamos que el contenido glicosomal fue liberado a partir de los 0,2 mg de digitonina y el contenido glicosomal a partir de los 0,4 mg (Figura

16B). Estos valores fueron similares a los reportados en la bibliografía para este método de fraccionamiento celular. Además de la caracterización de las fracciones por su actividad enzimática, realizamos ensayos de western blot en fracciones solubles e insolubles seleccionadas utilizando anticuerpos anti-*TcBDF3* y anticuerpos contra proteínas con distintas localizaciones subcelulares conocidas. De este modo, pudimos observar que *TcBDF3* es liberada a bajas concentraciones de digitonina pero no es completamente extraída en la fracción soluble. Se observó una banda inmunoreactiva para *TcBDF3* en todas las fracciones insolubles ensayadas, con un patrón similar al observado para la α -tubulina, que está presente en el citoesqueleto del parásito, o para PAR2, una proteína que compone la vara paraflagelar de *T. cruzi* (Figura 16C). Estos ensayos corroboran la localización no nuclear de *TcBDF3* y su presencia en las fracciones insolubles sugieren que, al menos una fracción de la proteína, está asociada a la membrana o citoesqueleto en epimastigotes de *T. cruzi*.

Luego, se inmunolocalizó *TcBDF3* en epimastigotes de *T. cruzi* mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (Figura 17).

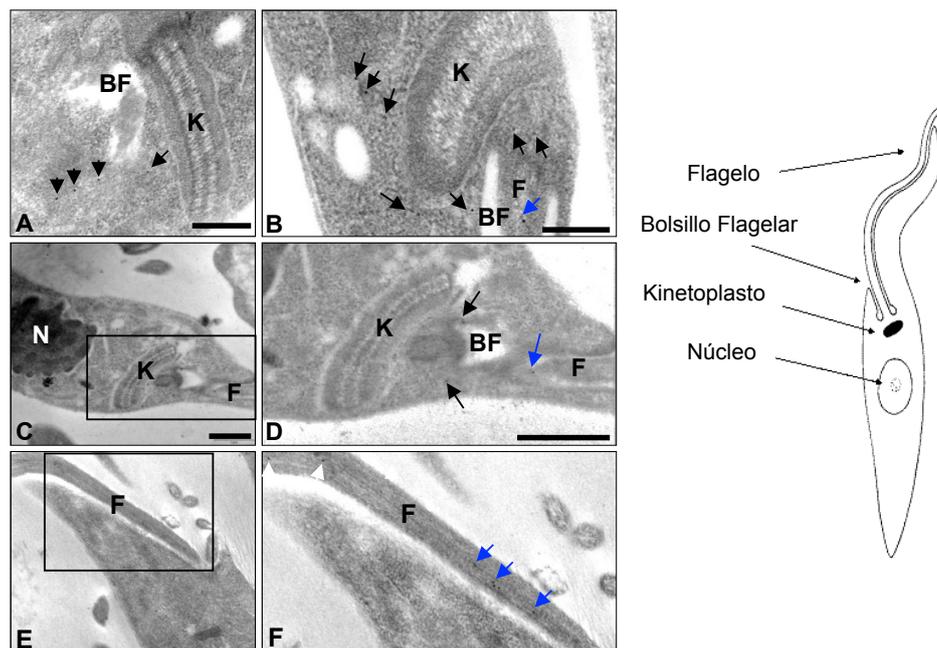


Figura 17: *TcBDF3* se localiza en el citoplasma, el flagelo y el bolsillo flagelar en epimastigotes. Inmunomicroscopías electrónicas de transmisión en epimastigotes de *T. cruzi* usando anticuerpos anti-*TcBDF3* de conejo. Se indican el núcleo (N), kinetoplasto (K), bolsillo flagelar (FP) y flagelo (F). Las partículas de oro se indican con flechas negras (y azules en el caso de la localización flagelar). D- Es la región indicada en C ampliada. F- Es la región indicada en E ampliada. Barra= 1 μ m. Se muestra un esquema de un epimastigotes y la ubicación del núcleo, kinetoplasto, bolsillo flagelar y flagelo (derecha).

No observamos la presencia de *TcBDF3* en estructuras que contienen DNA como el núcleo (N) y kinetoplasto (K). Se observó la presencia de partículas de oro en la parte interna del

flagelo (F), en la región del bolsillo flagelar (FP) y también dispersas en el citoplasma (Figura 17). A la derecha en la figura 17 se muestra un esquema de un epimastigote donde se indican las estructuras celulares mencionadas.

La localización observada mediante TEM, tanto en el citoplasma como en estructuras del citoesqueleto de *T. cruzi* concuerdan con los resultados obtenidos en el fraccionamiento subcelular con digitonina. Para complementar estos resultados se inmunolocalizó TcBDF3 en epimastigotes que sobre-expresan la proteína del bolsillo flagelar BILBO1 fusionada a la proteína fluorescente roja Cherry (esta línea fue construida y cedida por el Dr. Claudio Pereyra, UBA-CONICET) y se observó mediante microscopía confocal. BILBO1 es un componente del collar del bolsillo flagelar y como se observa en la figura 18, TcBDF3 colocaliza en esta región, corroborando los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica.

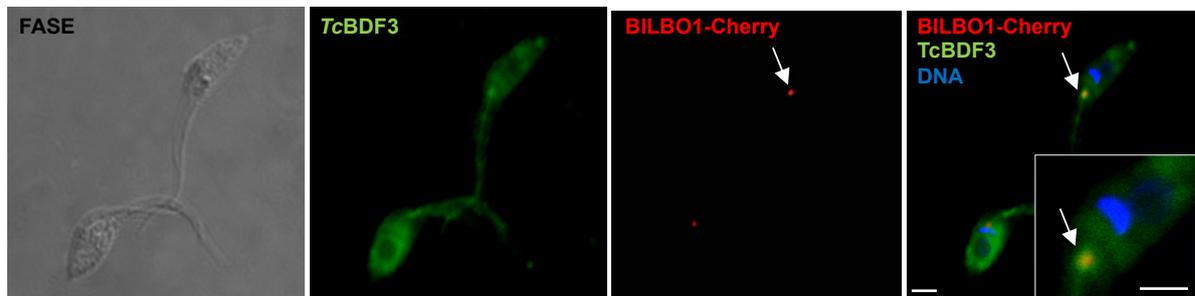


Figura 18: TcBDF3 está presente en el bolsillo flagelar. Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-TcBDF3 sobre epimastigotes que sobre-expresan la proteína de bolsillo flagelar BILBO1 fusionada a Cherry (cepa Y transflectada con el vector pTREXCherry-BILBO1). Se utilizó IgG anti-conejo conjugado a fluoresceína como anticuerpo secundario. El núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Barra= 2 μ m.

III.1.4 LOCALIZACIÓN DE TcBDF3 DURANTE EL CICLO DE VIDA

A continuación estudiamos la localización de TcBDF3 en los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* mediante ensayos de western blot en extractos totales de amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes. Se observó una sola banda inmunoreactiva del peso molecular esperado para los tres estadios evolutivos de *T. cruzi* (Figura 19A). Además observamos la localización subcelular de TcBDF3 en los distintos estadios mediante inmunomarcación y microscopía de fluorescencia (Figura 19B). En epimastigotes (E) TcBDF3 está presente en el citoplasma, el flagelo y la región del bolsillo flagelar, tal como se observó previamente. En amastigotes, tanto libres (A) como dentro de células eucariotas infectadas (Ac), se observa un patrón similar al de epimastigotes pero la región del bolsillo flagelar presenta un señal más intensa. En tripomastigotes, tanto metacíclicos (Tm) como sanguíneos (T), el patrón de expresión cambia y TcBDF3 se localiza solamente en el flagelo. Este cambio de localización y la presencia de un factor con bromodominio fuera del núcleo

en todos los estadios del ciclo de vida sugiere roles completamente nuevos para estos dominios proteicos.

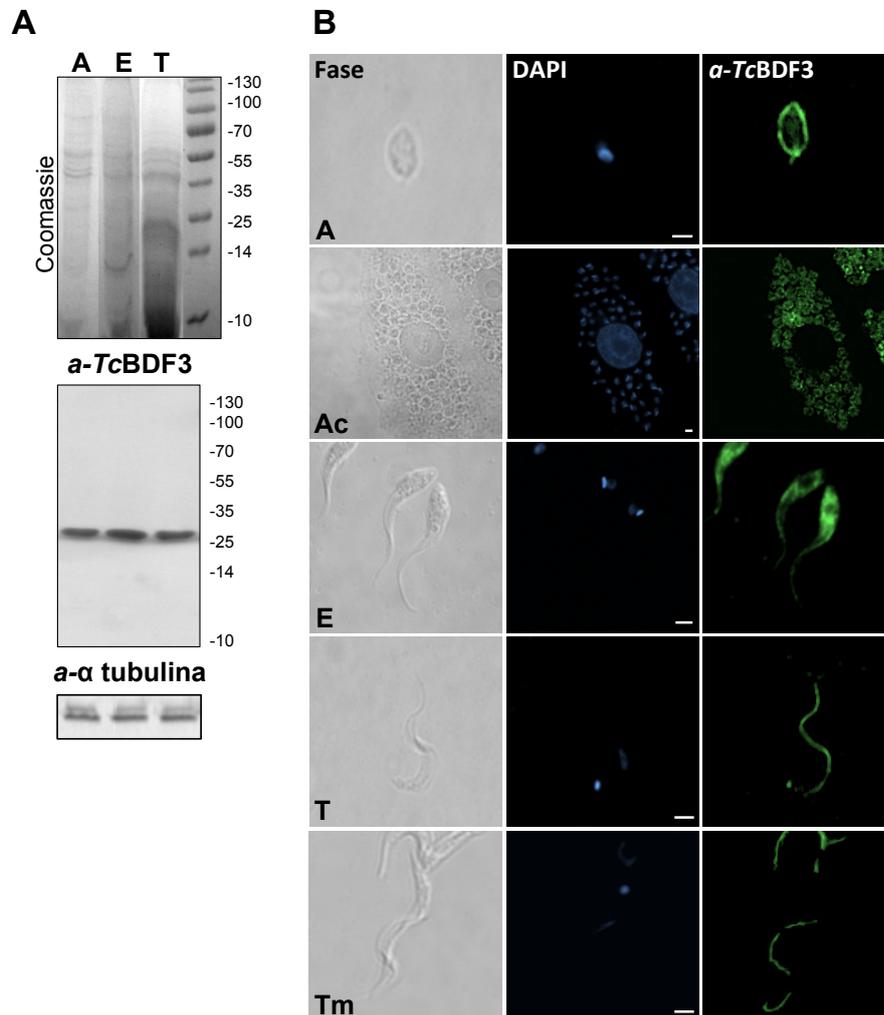


Figura 19: *TcBDF3* se expresa en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. A- Ensayos de western blot utilizando anticuerpos anti-*TcBDF3* (*a-TcBDF3*) de conejo y anti-tubulina (*a-α tubulina*) de ratón como control de carga. A, extractos proteicos totales de amastigotes; E, extractos proteicos de epimastigotes; T, extractos proteicos totales de tripomastigotes. El panel superior corresponde al SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. B- Ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-*TcBDF3* de conejo. A, amastigotes libres; Ac, amastigotes dentro de una célula de la línea Vero; E, epimastigotes; T, tripomastigote de células Vero infectadas; Tm, tripomastigote metacíclico obtenido mediante diferenciación de epimastigotes en medio TAU. Se utilizó IgG anti-conejo conjugado a fluoresceína como anticuerpo secundario. El núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Barra= 2 μ m

En los últimos años, se han identificados miles de proteínas acetiladas mediante espectrometría de masa de alta resolución (Choudhary et al., 2009, Yu et al., 2008, Zhang et al., 2009, Kim et al., 2006). A grandes rasgos podemos decir que esta MPT participa en una variedad muy grande de procesos celulares en diferentes organismos. En el año 2000, Kouzarides propuso que la acetilación era tan importante como la fosforilación y ambas que

podrían rivalizar como reguladores de procesos celulares. En ese escenario, el bromodominio sería análogo al dominio SH2 que reconoce fosfotirosinas pero aún no se han reportado cascadas de acetilación como ocurre con la fosforilación (Kouzarides, 2000). La presencia de *TcBDF3* fuera del núcleo y asociada al citoesqueleto nos permite pensar en un posible rol regulatorio mediante acetilación de lisinas en procesos celulares complejos totalmente diferente a lo reportado hasta el momento.

La presencia de *TcBDF3* en estructuras del citoesqueleto y flagelo tanto en epimastigotes como en tripomastigotes nos sugirieron que este bromodominio, de ser funcional, estaría interaccionando y reconociendo alguna proteína acetilada presente en estas estructuras. En *Trypanosoma cruzi* una de las proteínas acetiladas más abundantes del citoesqueleto es la α -tubulina. La misma es el componente mayoritario del corset de microtúbulos subpeliculares que recubre y le da forma al parásito así como de su axonema flagelar. Por lo tanto decidimos explorar esta hipótesis planteando distintos enfoques metodológicos.

III.1.5 LOCALIZACIÓN DE *TcBDF3* Y α -TUBULINA ACETILADA DURANTE LA METACICLOGÉNESIS

Para estudiar en profundidad el cambio de localización de *TcBDF3* entre epimastigotes y tripomastigotes se obtuvieron formas intermedias de diferenciación incubando a los epimastigotes en medio TAU como se detalla en la sección de materiales y métodos. Este medio imita las condiciones de estrés nutricional a las que son expuestos los epimastigotes al descender por el tracto digestivo del insecto vector y gatilla la diferenciación a la forma infectiva que luego es eliminada en la heces.

Los epimastigotes tienen un núcleo esférico con el flagelo protruyendo de la porción anterior del cuerpo celular. El kinetoplasto, de forma discoidal, se ubica entre el núcleo y el flagelo. Durante la metaciclogénesis se distinguen formas intermedias de diferenciación que presentan el kinetoplasto superpuesto al núcleo elongado debido a la migración del primero por sobre el segundo. Estas formas intermedias pueden clasificarse en tres tipos (Ferreira et al., 2008):

Forma intermedia Ia: posee un núcleo esférico que comienza a elongarse, el kinetoplasto se ubica en la parte anterior del parásito y tiene forma discoidal.

Forma intermedia Ib: el núcleo se sigue elongando y el kinetoplasto comienza a redondearse. Este último se ubica sobre el núcleo, en el medio del mismo.

Forma intermedia Ic: el núcleo está casi totalmente elongando y el kinetoplasto, de forma esférica, se ubica del lado posterior del cuerpo celular muy cercano al núcleo.

Los tripomastigotes metacíclicos se caracterizan por poseer núcleos totalmente alargados con un kinetoplasto esférico en el extremo posterior del parásito y el flagelo conectado a lo largo de todo el cuerpo celular. Se analizó la localización de *TcBDF3* y α -tubulina acetilada en estos estadios y pudimos observar que durante la diferenciación de epimastigote a tripomastigote *TcBDF3* se concentra o re-localiza en el flagelo (Figura 20). En la figura 20 se incluye un esquema de los estadios intermedios 1a, b y c.

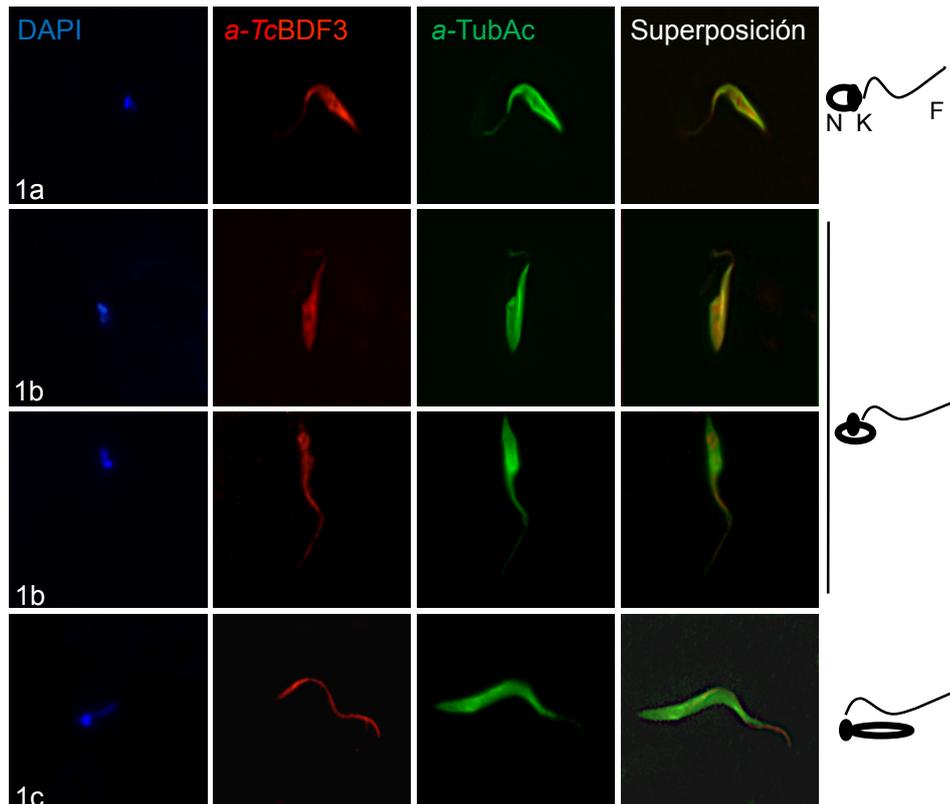


Figura 20: *TcBDF3* cambia de localización durante la metaciclogénesis *in vitro*. Ensayos de inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-*TcBDF3* de conejo (a-*TcBDF3*) y anti- α -tubulina acetilada monoclonal de ratón (a-TubAc) en estadios intermedios de diferenciación seleccionados. A la derecha se muestra un esquema de la posición del flagelo (F), núcleo (N) y kinetoplasto (K) en los tres estadios intermedios de diferenciación 1a, 1b y 1c. Se utilizó IgG anti-ratón conjugada a Fluoresceína y anti-conejo conjugada a Cy3 como anticuerpos secundarios. El núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI (azul).

La tubulina acetilada fue detectada en todo el cuerpo celular del parásito como ya había sido reportado por Souto-Padron y colaboradores (Souto-Padron et al., 1993), sin cambios significativos entre los estadios de diferenciación. Se pudo observar una co-localización parcial entre estas dos proteínas en los estadios intermedios, especialmente en el flagelo, lo que sugiere una asociación entre *TcBDF3* y la estructura microtubular en *T. cruzi*.

Como se explicó en la introducción, los microtúbulos conforman el corset subpelicular, el axonema flagelar, el bolsillo flagelar y la zona de unión al flagelo (FAZ) presente en

tripanosomátidos (Kohl & Gull, 1998). Existen múltiples isotipos de tubulina presentes en los microtúbulos debido a MPT que se producen en esta proteína. Entre todas las isoformas de tubulina asociadas a los microtúbulos subpeliculares y flagelares de *T. cruzi* aparentemente el isotipo acetilado parece ser el predominante (Souto-Padron et al., 1993). No conocemos aún el mecanismo por el cual *TcBDF3* cambia de localización. Podemos plantear dos hipótesis, *TcBDF3* es degradada en el citoplasma y microtúbulos sub-peliculares pero no en el flagelo o existe una re-localización o migración de ella hacia el flagelo.

III.1.6 CO-LOCALIZACIÓN DE *TcBDF3* Y α -TUBULINA ACETILADA EN CITOESQUELETOS Y FLAGELOS AISLADOS

A continuación se obtuvieron citoesqueletos y complejos flagelares aislados de epimastigotes y tripomastigotes mediante extracción con detergente y alta concentración de sales. En estas condiciones, solo el axonema, el cuerpo basal y el kinetoplasto conectado, la vara paraflagelar y el cuarteto de microtúbulos asociado a la FAZ se mantienen (Bastin et al., 2000). Los mismos fueron utilizados para determinar la presencia de *TcBDF3* en estas estructuras mediante microscopia de fluorescencia. Además, realizamos co-localizaciones con α -tubulina acetilada y PAR2 que es una proteína de la vara paraflagelar de *T. cruzi*. En flagelos aislados es posible distinguir el axonema flagelar (marcado con α -tubulina acetilada) de la vara paraflagelar (marcado con PAR2), ya que ambas estructuras se encuentran ubicadas paralelamente dentro del flagelo.

En citoesqueletos de epimastigotes (E) se observa que *TcBDF3* está presente en regiones discretas con una marca más intensa en la región del bolsillo flagelar (Figura 21A, panel superior). En los flagelos aislados se observa una co-localización parcial con tubulina acetilada (Figura 21A, panel inferior). El protocolo utilizado para obtener los complejos flagelares aislados en ocasiones no logra solubilizar completamente a un grupo de microtúbulos unidos a los cuerpos basales que forman el bolsillo flagelar. Al observar estas estructuras resistentes al tratamiento detectamos la presencia tanto de *TcBDF3* como α -tubulina acetilada (Figura 21A, columna derecha, ampliaciones). Estos resultados sugieren que *TcBDF3* co-localiza con α -tubulina acetilada en regiones discretas del citoesqueleto, pero se observan regiones donde se detecta tubulina acetilada pero no *TcBDF3*. En tripomastigotes (T), *TcBDF3* solo está presente en el flagelo donde también co-localiza con α -tubulina acetilada (Figura 21A).

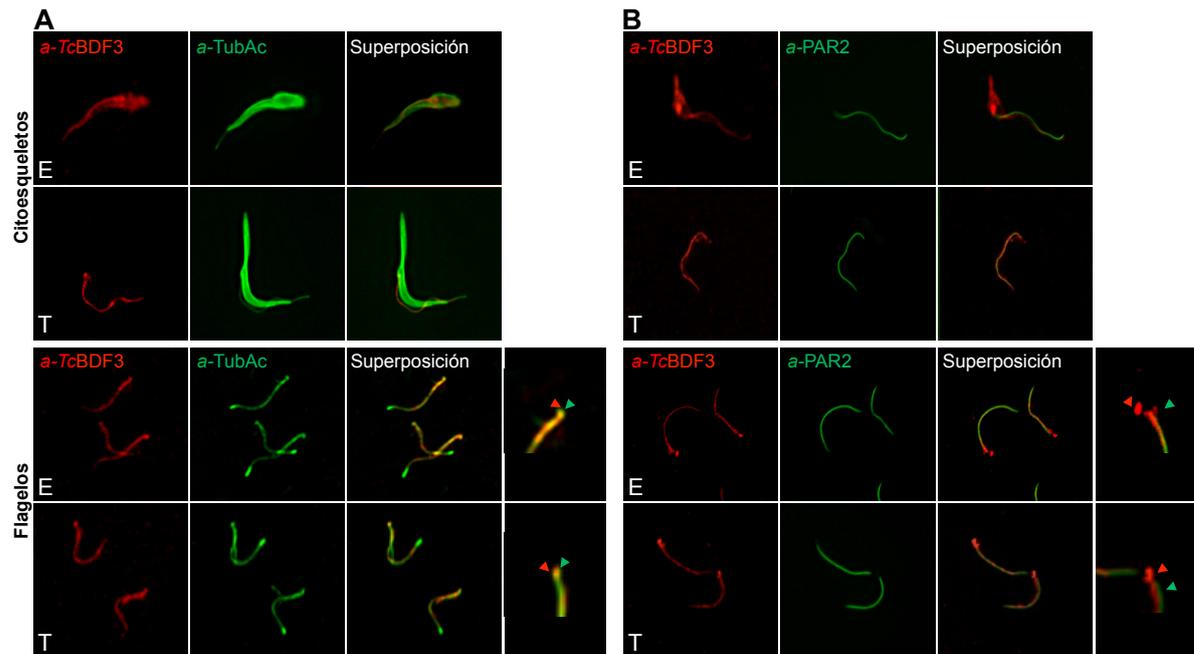


Figura 21: *TcBDF3* está presente en citoesqueletos y flagelos aislados de epimastigotes (E) y solo en el flagelo de tripomastigotes metacíclicos (T). Ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-*TcBDF3* y anti-tubulina acetilada (A) y anti-PAR2. (B) en citoesqueletos y flagelos aislados de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos. La última columna de cada panel corresponde a las imágenes ampliadas de las estructuras resistentes al tratamiento con detergente que corresponden a los microtúbulos del cuerpo basal. Las flechas verdes indican la localización de *TcBDF3* y las rojas la de tubulina acetilada (A) o PAR2 (B). Se utilizó IgG anti-conejo conjugada a Fluoresceína y anti-ratón conjugada a Rhodamina como anticuerpos secundarios. El núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI (azul).

Además, se comparó la localización de *TcBDF3* con PAR2 para determinar si el bromodominio estaba presente en la vara paraflagelar (Figura 21B). Esta estructura electrónicamente densa comienza en la región donde el flagelo emerge del bolsillo flagelar y corre paralela al axonema hasta la punta distal del flagelo. Observamos que tanto en epimastigotes como en tripomastigotes estas dos proteínas no co-localizan sino que corren paralelas una a la otra. Esto sugiere que *TcBDF3* está presente en el axonema flagelar y no en la vara paraflagelar. También observamos la presencia de *TcBDF3* y ausencia de PAR2 en la región del bolsillo flagelar resistente al tratamiento en los flagelos aislados (Figura 21B, columna derecha).

III.1.7 ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE *TcBDF3* Y α -TUBULINA ACETILADA *IN VIVO*

Para determinar si *TcBDF3* y α -tubulina realmente están interaccionando entre sí y si el bromodominio es capaz de reconocer y unirse a la tubulina acetilada utilizamos enfoques tanto *in vivo* como *in vitro*. Primero, se realizaron ensayos de western blot utilizando extractos enriquecidos en proteínas del citoesqueleto y flagelo. Se obtuvieron tres fracciones correspondientes a proteínas solubles totales, solubles del citoesqueleto e insolubles del

citoesqueleto y flagelo. Las mismas fueron obtenidas por extracción diferencial con detergente y NaCl, con un protocolo que se basa en el mismo fundamento que el utilizado sobre parásitos enteros obtener citoesqueletos aislados (Schneider et al., 1987). TcBDF3 y α -tubulina acetilada son detectadas juntas en la fracción soluble total y también en la fracción que corresponde a proteínas insoluble del citoesqueleto y flagelo (Figura 22A). Estos resultados sugieren que la interacción entre ambas proteínas está restringida a compartimientos celulares específicos, ya que en la fracción de proteínas solubles del citoesqueleto no vemos presencia de TcBDF3 pero sí de la α -tubulina acetilada. Concretamente, TcBDF3 no se encontraría asociada con proteínas solubles del citoesqueleto, pero sí en la fracción insoluble. Esto avala la idea de que TcBDF3 estaría interactuando con alguna proteína (presumiblemente la α -tubulina) en el citoesqueleto propiamente dicho.

Luego, se evaluó la interacción de TcBDF3 con α -tubulina acetilada por co-inmunoprecipitación, para lo cual se utilizaron extractos proteicos enriquecidos en proteínas del citoesqueleto y anticuerpos anti-TcBDF3 acoplados covalentemente a esferas magnéticas. Los extractos se incubaron con los anticuerpos acoplados a las esferas, se lavaron para eliminar las interacciones no específicas y luego se eluyó el complejo y se analizó mediante western blot con anticuerpos anti-TcBDF3 de conejo y anti- α -tubulina acetilada de ratón (Figura 22B). Como control se utilizaron esferas acopladas al anticuerpo anti-proteína A de conejo. Ambas proteínas fueron detectadas en el complejo eluido, demostrando que TcBDF3 y la α -tubulina acetilada son capaces de interactuar *in vivo*. Este mismo resultado se obtuvo al utilizar otro protocolo de co-inmunoprecipitación con Proteína G-agarosa (datos no mostrados).

Al teñir con plata el SDS-PAGE del complejo eluido luego de la inmunoprecipitación se pueden observar diferentes bandas (Figura 22B). Para dilucidar la composición del complejo proteico del cual forma parte TcBDF3, cinco de estas bandas se escindieron del gel y se enviaron a analizar por espectrometría de masa al servicio de Proteómica del Instituto Pasteur de Montevideo. Sólo dos de las muestras enviadas para el análisis pudieron ser asignadas, ya que las demás estaban contaminadas. Los péptidos identificados corresponden a tubulina y a una triparedoxin peroxidasa. No se pudo identificar a TcBDF3 mediante espectrometría de masa pero la inmunoprecipitación fue verificada por western blot utilizando anticuerpos específicos a TcBDF3 como se explicó anteriormente. Por otro lado, solo se pudo identificar a la tubulina en el complejo pero no distinguir si se encontraba acetilada.

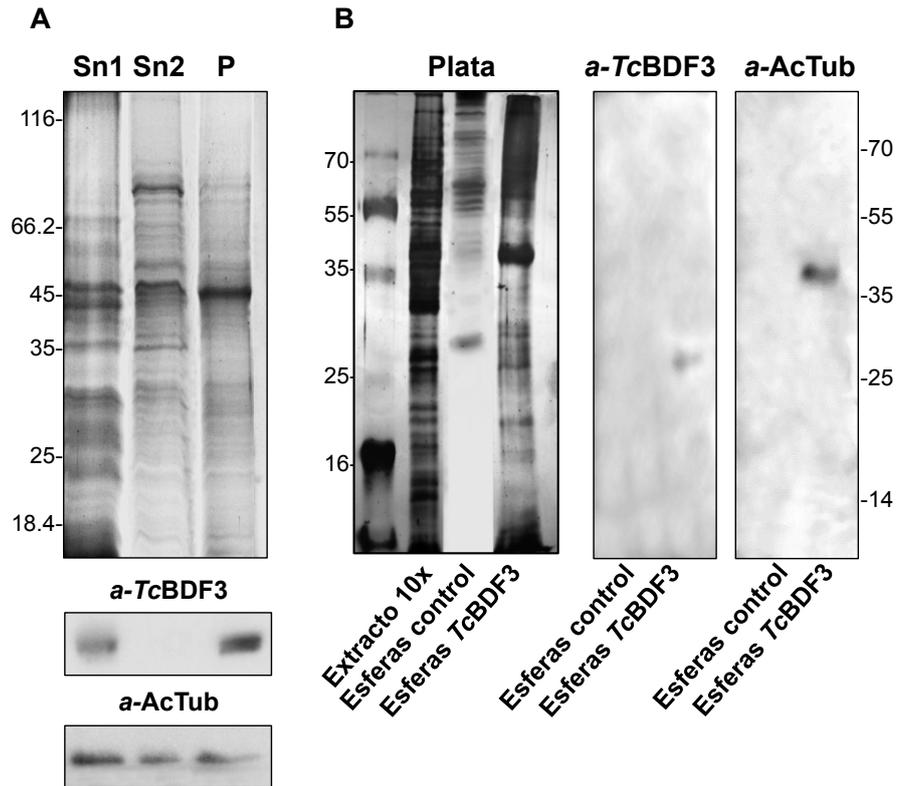


Figura 22: *TcBDF3* interacciona con tubulina acetilada in vivo. A- SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie y ensayos de western blot de extractos enriquecidos en proteínas del citoesqueleto y flagelo. Sn1, proteínas solubles totales; Sn2, proteínas solubles del citoesqueleto y flagelo; P, proteínas insolubles del citoesqueleto y flagelo. Se utilizaron anticuerpos anti-*TcBDF3* (*a-TcBDF3*) de conejo y anti- α -tubulina acetilada monoclonales de ratón (*a-AcTub*). B- Ensayos de co-inmunoprecipitación usando anticuerpos anti-*TcBDF3* acoplados a esferas magnéticas y acoplados a anti-proteína A (Esferas Control) como control negativo. A la izquierda se observa el SDS-PAGE teñido con plata de los extractos totales y las eluciones obtenidas luego de la inmunoprecipitación. A la derecha se encuentra el ensayo de western blot de las eluciones con anticuerpos anti-*TcBDF3* y anti-tubulina acetilada.

Las triparedoxin peroxidases fueron caracterizada en *Trypanosoma cruzi* y catalizan diferentes reducciones de peróxidos utilizando triparedoxina como sustrato reductor. Estas enzimas junto con el tripanotion, la tripanotion reductasa y el NADPH son los encargados de mantener el estado redox del parásito. Una de las triparedoxin peroxidases está presente en el citoplasma (la otra en mitocondria) y es importante para la infección y para la protección contra el estrés oxidativo. Además, aumenta su expresión durante la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos (Wilkinson et al., 2000, Piacenza et al., 2008, Piñeyro et al., 2011). La secuencia de la triparedoxin peroxidasa citoplasmática (*TcCLB.507259.10*) identificada mediante espectrometría de masa se comparó con la base de datos de proteínas humanas mediante BLAST y se encontró que presenta homología con la peroxiredoxina 1 y 2 (64% de identidad) y con una peróxido reductasa dependiente de tioredoxina (60% de identidad). Llamativamente, la peroxiredoxinas humanas son proteínas

regulatorias del metabolismo redox que son desacetiladas por HDAC6 específicamente (Parmigiani et al., 2008). HDAC6 es una desacetilasa citoplasmática que modifica a la α -tubulina en mamíferos, como se explicó en la introducción. Este resultado, aunque es preliminar, nos lleva a pensar que *TcBDF3* podría estar formando parte de un complejo junto con enzimas desacetilasas/acetiltransferasas que modificarían a la α -tubulina así como a otros sustratos citoplasmáticos no conocidos aún. En *T. cruzi* no se ha caracterizado aún ninguna desacetilasa de tubulina pero pensamos que algún homólogo a HDAC6 humana debería cumplir este rol fundamental para todas las células eucariotas. Recordemos que en *Leishmania* se reportó una desacetilasa NAD-dependiente con capacidad de modificar tubulina.

III.1.8 ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE *TcBDF3* Y α -TUBULINA ACETILADA *IN VITRO*

A continuación, para evaluar la especificidad de unión de *TcBDF3* por la α -tubulina acetilada se realizaron ensayos de far western blot. Para esto, se adhirieron péptidos sintéticos de α -tubulina acetilada y sin acetilar e Histona H4 acetilada en membranas de nitrocelulosa. Luego se incubaron estas membranas con las proteínas recombinantes *TcBDF3*-His y *TcBDF2*-His. Las proteínas unidas se detectaron por western blot con anticuerpos anti-Histidina (Figura 23).

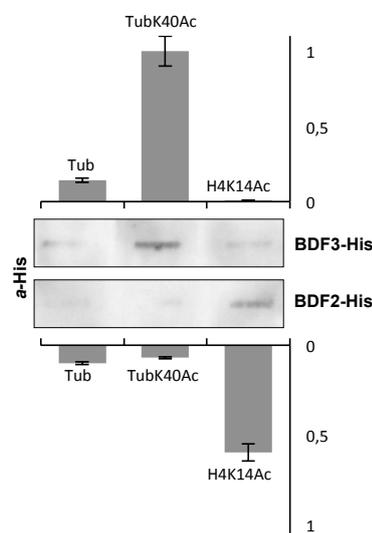


Figura 23: *TcBDF3* interacciona específicamente con α -tubulina acetilada *in vitro*. Se adhirieron péptidos sintéticos de α -tubulina acetilada (TubK40Ac) y sin acetilar (Tub) e Histona H4 acetilada (H4K14Ac) en membranas de nitrocelulosa y luego se incubaron con BDF3-his y BDF2-his recombinantes. La proteína adherida se detectó mediante western blot con anticuerpos anti-histidina (a-His). Las señales se cuantificaron por densitometría y se normalizaron usando la interacción con el péptido de tubulina acetilada como referencia (se le asignó el valor arbitrario de 1). Las columnas y barras de error indican mediana \pm desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes.

El protocolo utilizado para purificar estas proteínas recombinantes fue puesto a punto durante la Tesis doctoral de la Dra. Vanina Villanova y el correcto plegamiento de las mismas se corroboró mediante espectros de dicroísmo circular.

No se observó reactividad cruzada entre los bromodominios. *TcBDF2* recombinante solo reconoció al péptido H4K14Ac tal como se había reportado previamente por nuestro grupo, y *TcBDF3* solo reconoció al péptido de tubulina acetilada. Esto sugiere que cada bromodominio puede reconocer o unirse a uno, o a un número limitado, de residuos específicos de lisina acetilada, teniendo cierta capacidad de discriminación según el entorno de la lisina tal como se propuso para otros bromodominios.

III.1.9 ESTADO MULTIMÉRICO DE *TcBDF3* *IN VITRO*

Como se mencionó en la introducción, en eucariotas superiores los bromodominios se encuentran generalmente asociados a otros dominios o actividades enzimáticas en el mismo polipéptido. Además, son capaces de interactuar con otras proteínas formando complejos multiméricos y en algunos casos forman dímeros entre ellos. La proteína TAF_{II}250 humana pertenece a la familia BET y posee dos bromodominios en tándem característicos de esta familia. Esta proteína es parte del complejo proteico TFIID que actúa como regulador transcripcional. Se ha reportado que ambos bromodominios tienen la capacidad de interactuar entre sí (en distintas proteínas) mediante interacciones electroestáticas entre la región de la hélice α_A y el bucle ZA del primer dominio y la región de la hélice α_B y bucle ZA del segundo formando un dímero asimétrico (Jacobson et al., 2000). Otro bromodominio capaz de dimerizar tanto *in vivo* como *in vitro* es el primer bromodominio de BRD2 humana (también de la familia BET). En este caso, se forma un homodímero que tiene mayor afinidad por péptidos de Histona H4 acetilados en la Lisina 12 que los monómeros mutantes incapaces de dimerizar. Para *HsBDF2*, las regiones de interacción entre los bromodominios se encuentran en las hélices α_B y α_C y el bucle BC (Nakamura et al., 2007). Se postula que estas diferencias en las regiones de interacción entre proteínas de la misma familia se correlacionan con el mecanismo de reconocimiento de sus sustratos, que en este caso serían diferentes lisinas acetiladas en las colas N-terminales de histonas.

TcBDF3 no presenta homología con otros dominios asociados a bromodominios pero su estructura primaria sugiere que podría interactuar con otras proteínas, ya que presenta una región C-terminal rica en aminoácidos ácidos y básicos, característicos de regiones de interacción proteína-proteína. Por esto, decidimos analizar el estado multimérico de *TcBDF3* recombinante por cromatografía de exclusión molecular (Figura 24).

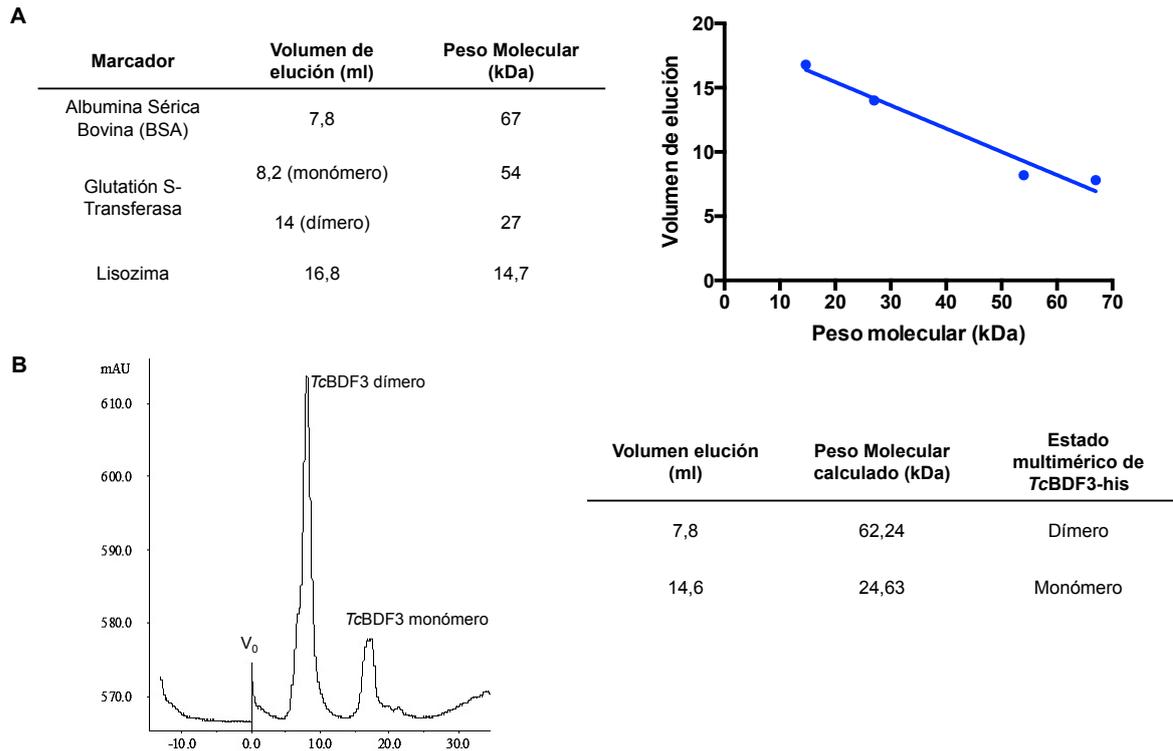


Figura 24: *TcBDF3* se encuentra mayoritariamente como dímero en solución. A- Peso molecular de proteínas conocidas y la curva de calibración construida a partir de los volúmenes de elución obtenidos para cada una. B- Cromatograma de *TcBDF3*-his obtenido por cromatografía de exclusión molecular. V_0 , volumen muerto, determinado usando azul de dextrano. El peso molecular calculado para *TcBDF3*-His se obtuvo extrapolando los volúmenes de elución obtenidos a partir de la curva de calibración.

Mediante este método, se obtuvieron los volúmenes de exclusión para distintas proteínas de peso molecular conocido y se construyó una curva de calibración para luego calcular por extrapolación el peso molecular de *TcBDF3*-his (Figura 24A). Observamos que *TcBDF3*-His se encuentra mayoritariamente como dímero *in vitro* (Figura 24B). Estos resultados sugieren que *TcBDF3* podría formar dímeros para cumplir su función.

III.1.10 DISCUSIÓN GENERAL

La acetilación de tubulina es una modificación ampliamente distribuida en todas las células eucariotas. Se ha asociado con estructuras microtubulares estables y se localiza en cilios, centriolos y subgrupos de MT citoplasmáticos (observado en células 3T3 y Hela) (Piperno et al., 1987). En *Chlamydomonas* se observó la presencia de tubulina acetilada en el axonema flagelar, el cuerpo basal y en MT citoplasmáticos (Piperno & Fuller, 1985) mientras que en neuronas, su distribución no es homogénea predominando en los axones proximales (Janke & Kneussel, 2010). En tripanosomátidos, esta isoforma es la más abundante y esta uniformemente distribuida en todas las estructuras microtubulares, incluyendo el huso mitótico intranuclear (Sasse & Gull, 1988, Souto-Padron et al., 1993). Otra diferencia entre los MT de tripanosomátidos y los de mamíferos es su resistencia a agentes

despolimerizantes de tubulina. Si se incuban epimastigotes de *T. cruzi* a 0°C, temperatura a la cuál los MT citoplasmáticos de otros eucariotas se despolimeriza, ni el corset subpelicular ni el axonema flagelar presenta alteraciones morfológicas. Tampoco ocurren alteraciones al tratar con los agentes despolimerizantes Colchicina o Vinblastina, utilizando concentraciones que alteran los MT mamíferos (Souto-Padron et al., 1993, Grellier et al., 1999, Dantas et al., 2003). Al tratar epimastigotes con el agente estabilizante de microtúbulos Taxol se observa una inhibición de la replicación y alteraciones morfológicas groseras pero sin pérdida de la movilidad (Baum et al., 1981). Se demostró también que los tripomastigotes son más sensibles al Taxol pero no se observaron cambios en los microtúbulos subpeliculares y flagelares en ambas formas evolutivas cuando se utilizan concentraciones que afectan a los microtúbulos de mamíferos (Dantas et al., 2003). En *Leishmania infantum* se observó que, tratando con bajas concentraciones de Taxol, la tubulina acetilada se acumula en el polo posterior de la célula junto una desacetilasa de tubulina NAD⁺-dependiente (Tavares et al., 2008). Esta información refuerza la idea de que los microtúbulos de tripanosomátidos tienen características diferentes a los de otros organismos. Teniendo en cuenta estas observaciones, sería interesante en el futuro evaluar si la tubulina acetilada y TcBDF3 en *T. cruzi* también sufren modificaciones en su localización al tratar con agentes estabilizantes/desestabilizantes de tubulina.

En un grupo pequeño de organismos unicelulares no se observó la presencia de α -tubulina acetilada en ningún tipo de MT y se correlacionó esta observación con la presencia de un sistema microtubular más simple con husos mitóticos grandes y algunos microtúbulos citoplasmáticos (Janke & Kneussel, 2010). Por otro lado, se ha propuesto que los cilios y flagelos emergieron tempranamente en la evolución eucariota y que organismos primitivos podrían poseer modificaciones post-traduccionales exclusivas de estas estructuras. Estas modificaciones luego habrían sido adaptadas a otras estructuras microtubulares a lo largo de la evolución (Janke & Bulinski, 2011). Teniendo en cuenta que los tripanosomátidos divergieron tempranamente y que poseen una estructura microtubular compleja diferente a otros organismos, podemos pensar que la acetilación de tubulina en estos organismos podría tener un rol preponderante en la dinámica del citoesqueleto que luego se perdió parcialmente en eucariotas superiores.

Se ha propuesto que existe un código de tubulina, donde las distintas combinaciones de MPT podrían ser leídas e interpretadas por proteínas asociadas a microtúbulos. Inicialmente, se postuló que este código podría ser interpretado por tres clases de proteínas: las proteínas asociadas a microtúbulos **MAPs** (del inglés “Microtubule Associated Protein”) como Tau, MAP1 y MAP2 que se unen estáticamente en toda la longitud del microtúbulo;

por proteínas de unión al extremo (+) (**+TIPs**) que se unen de manera transiente a los extremos positivos de los microtúbulos que están en crecimiento; y por **motores moleculares** que usan la energía de la hidrólisis de ATP para transportar “cargas” a través de los microtúbulos usándolos de vías (Verhey & Gaertig, 2007). Los resultados presentados hasta aquí muestran que *TcBDF3* se une a tubulina acetilada tanto *in vivo* como *in vitro*, que es capaz de dimerizar *in vitro* y estaría formando parte de un complejo multiproteico. Algo importante para destacar es que estas proteínas de unión a microtúbulos interactúan con la superficie de los mismos pero la lisina 40 que se encuentra acetilada se ubica hacia el lumen de estas estructuras huecas. Recientemente, se describió que la acetilasa de tubulina α TAT humana es capaz de difundir dentro del lumen de los microtúbulos para modificarlos (Szyk et al., 2014). En este contexto, el bromodominio podría ser un nuevo tipo de proteína asociada a microtúbulos capaz de leer e interpretar el código de tubulina desde el interior de los microtúbulos. Se pueden proponer por lo menos dos modelos para el mecanismo de acción de *TcBDF3*. Haciendo un paralelo con los bromodominios que unen histonas, un complejo proteico que contenga a *TcBDF3* podría estar trasladando una actividad enzimática al flagelo para modificar a la tubulina o a algún otro componente del citoesqueleto. Otra posibilidad es que *TcBDF3* transporte tubulina acetilada hacia el flagelo. Por otro lado, no se puede descartar que simplemente *TcBDF3* se esté uniendo a la lisina acetilada para proteger a este residuo de la acción de otras enzimas que lo puedan modificar.

A continuación desarrollamos distintos enfoques metodológicos para tratar de averiguar la función de *TcBDF3* en *Trypanosoma cruzi*. Los mismos se basan en la sobre-expresión de versiones truncadas y mutantes puntuales del bromodominio. Además se purificó *TcBDF3* mutante recombinante para ensayos de interacción *in vitro*.

III.2 ANÁLISIS FUNCIONAL DE *TcBDF3* EN *TRYPANOSOMA CRUZI*

En este capítulo se discutirán los resultados obtenidos al sobre-expresar distintas construcciones mutantes de *TcBDF3* en *T. cruzi* y la capacidad de las mismas de interactuar con la tubulina acetilada.

III.2.1 SOBRE-EXPRESIÓN DE UNA VERSIÓN TRUNCADA DE *TcBDF3*

Como se detalló en el capítulo anterior, observamos un cambio de localización de *TcBDF3* durante el proceso de metacicloogénesis y que esta proteína interactúa con α -tubulina acetilada presente en el citoesqueleto y flagelo de *T. cruzi*. Para estudiar en más detalle este cambio de localización se sobre-expresó *TcBDF3* entera y una versión truncada (que solo presenta el bromodominio) fusionadas a la proteína fluorescente cian (CFP). Elegimos esta estrategia de sobre-expresión para obtener mutantes dominantes negativos en *T. cruzi* ya que nos pareció la más adecuada debido a la imposibilidad de utilizar RNA interferentes en este organismo. Como ya se mencionó, el extremo C-terminal de *TcBDF3* se encuentra desestructurado y presenta regiones ricas en aminoácidos ácidos y básicos, por lo que pensamos que tal vez *TcBDF3* podría interactuar con otras proteínas a través de este extremo. Si esta región es absolutamente necesaria para la función de la proteína, su remoción debería alterar esta función y, eventualmente, generar algún tipo de fenotipo observable.

Se utilizó el vector del Sistema Gateway (Sistema de clonado por recombinación, Invitrogen) p*TcCFPN* construido por Batista y colaboradores para generar las fusiones a CFP (Batista et al., 2010). Las construcciones se transfectaron en epimastigotes de la cepa Dm28c y luego de seleccionarlos con G418 se realizaron curvas de crecimiento (Figura 25A). Como controles de crecimiento se utilizó la cepa salvaje y epimastigotes transfectados con el plásmido vacío. Además, se cuantificó la capacidad de realizar metacicloogénesis espontáneamente e inducida por estrés nutricional en medios específicos (TAU) de todas estas líneas (Figura 25B). Observamos que *TcBDF3* Δ C presentan una tasa de crecimiento menor que los controles y su capacidad de realizar metacicloogénesis también se ve disminuida en las condiciones ensayadas. Estos resultados sugieren que el extremo C-terminal de *TcBDF3* es importante para el crecimiento y la diferenciación en epimastigotes, tal vez debido a la imposibilidad de la versión truncada de formar un complejo con otras proteínas como ocurre con otros bromodominios de mamíferos. Se ha reportado que mutantes truncados de BRD2 humana se deslocalizan y no son capaces de unirse a los cromosomas mitóticos. BRD2 pertenece a la familia BET y presenta dos bromodominios en tandem y una región extra terminal. Al eliminar 47 aminoácidos de esta región extra terminal

se pierde la capacidad de dimerizar que posee BRD2 y esto hace que su función se vea comprometida (García-Gutierrez et al., 2012).

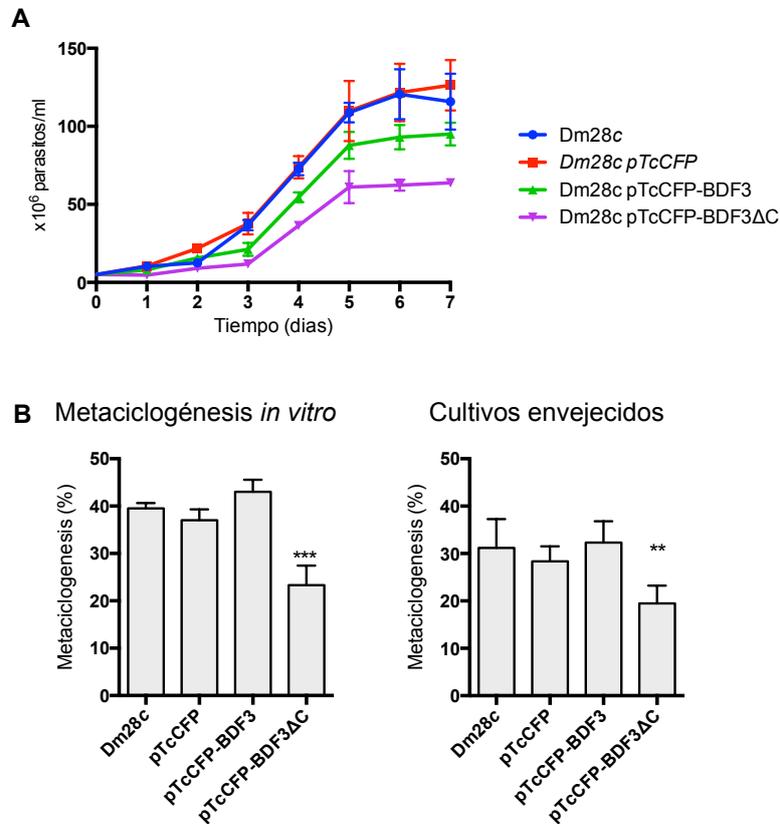


Figura 25: La sobre-expresión de una versión truncada de *TcBDF3* disminuye el crecimiento y la tasa de metacirculación. A- Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* salvajes (Dm28c), transfectados con el vector vacío (pTcCFP), que sobre-expresan *TcBDF3* fusionada a CFP (Dm28c pTcCFP-BDF3) y que sobre-expresan la proteína truncada (Dm28c pTcCFP-BDF3ΔC). B- Ensayo de metacirculación *in vitro* con medio TAU y en cultivos envejecidos 12 días de las distintas líneas. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$.

En función de estos resultados, decidimos detectar la presencia de las proteínas fusionadas a CFP mediante microscopía confocal en los epimastigotes y tripomastigotes transfectados. Pudimos observar que en tripomastigotes la proteína truncada se pierde su localización habitual y no es capaz de concentrarse en el flagelo. La expresión de CFP-*TcBDF3* y CFP-*TcBDF3*ΔC se corroboró mediante ensayos de western blot con anticuerpos anti-*TcBDF3* (Figura 26).

Como ya mencionamos, los bromodominios de la familia BET se caracterizan por la presencia de uno o dos bromodominios en tandem y una secuencia extra-terminal (ET). Dentro de esta última secuencia, cuya función todavía no es clara, existen tres regiones separadas. Una de estas regiones, denominada dominio N-terminal ET (NET), está conservado en todas las proteínas BET y se asume que su función es la unión de otras

Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de proteínas no nucleares en *Trypanosoma cruzi*

proteínas. Este dominio tiene una región de aminoácidos ácidos que podría ser el responsable de la interacción con otras proteínas y/o el ADN.

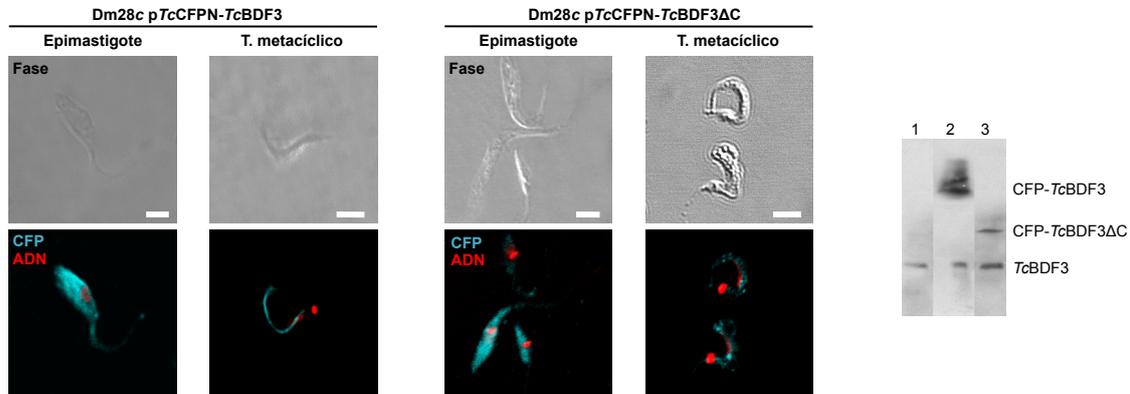


Figura 26: La versión truncada de TcBDF3 se deslocaliza en tripomastigotes. Microscopia confocal de epimastigotes y tripomastigotes que sobre-expresan TcBDF3-CFP y TcBDF3ΔC-CFP. El ADN del núcleo y kinetoplasto se marcó con ioduro de Propidio. A la derecha se observa un ensayo de western blot con anticuerpos anti-TcBDF3 sobre extractos totales de epimastigotes salvajes (1), líneas que sobre-expresan TcBDF3-CFP (2) y líneas que sobre-expresan TcBDF3ΔC-CFP (3).

Debido a que TcBDF3 también tiene una región rica en aminoácidos ácidos decidimos comparar su secuencia con dominios NET conocidos y observamos una identidad/similitud de entre 30-40% (Figura 27).

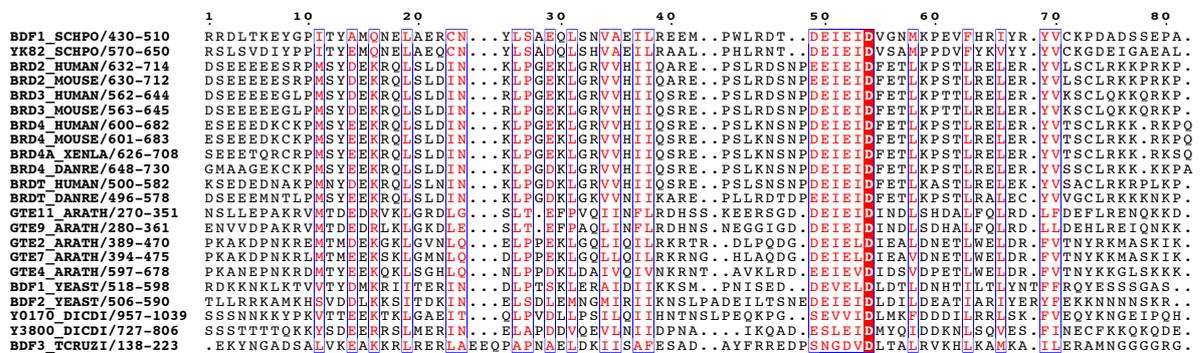


Figura 27: Alineamiento de la secuencia aminoacídica del extremo C-terminal de TcBDF3 con secuencias de dominios NET conocidas. Los alineamientos se realizaron con el programa ClustalX y fueron curados manualmente y editados en el servidor ESPript. Los residuos idénticos se indican en blanco con fondo rojo y los cambios conservados en rojo con fondo blanco.

Cabe mencionar que por tratarse de secuencias de baja complejidad, esta similitud no fue detectada en los análisis realizados mediante el programa BLAST. Estos resultados sugieren que la región C-terminal de TcBDF3 podría ser importante para la localización flagelar de la proteína en tripomastigotes y la responsable de interactuar con otras proteínas, presumiblemente con actividad catalítica, como ocurre con bromodominios de otras especies. Además, nos llevan a pensar que TcBDF3 podría tener una participación

activa en el proceso de metaciclologénesis en *T. cruzi* ya que la sobre-expresión de la versión truncada disminuye las tasas de metaciclologénesis *in vitro*.

III.2.2 DISEÑO DE MUTANTES PUNTUALES DE TcBDF3

Para caracterizar funcionalmente al factor con Bromodominio 3 decidimos realizar mutantes puntuales en aminoácidos claves para la interacción con el residuo de acetil lisina. En el trabajo de Dhalluin y colaboradores, como se explicó en la Introducción, se evaluaron los efectos de las mutaciones puntuales en el bromodominio PCAF humano mediante espectros ¹⁵N-HSQC (Dhalluin et al., 1999). Decidimos utilizar este trabajo como referencia para diseñar los mutantes puntuales de TcBDF3. La secuencia aminoacídica del bromodominio de TcBDF3 fue alineada con la secuencia de PCAF (Figura 28). Elegimos mutar los aminoácidos Y103 y L110 de TcBDF3 por alanina (A) que corresponden a las dos primeras mutaciones de PCAF (Figura 28, flechas negras). Elegimos estas mutaciones ya que las mismas no generaron cambios estructurales significativos y su afinidad por el ligando (péptidos de histona H4) se vio reducida significativamente en el bromodominio humano.

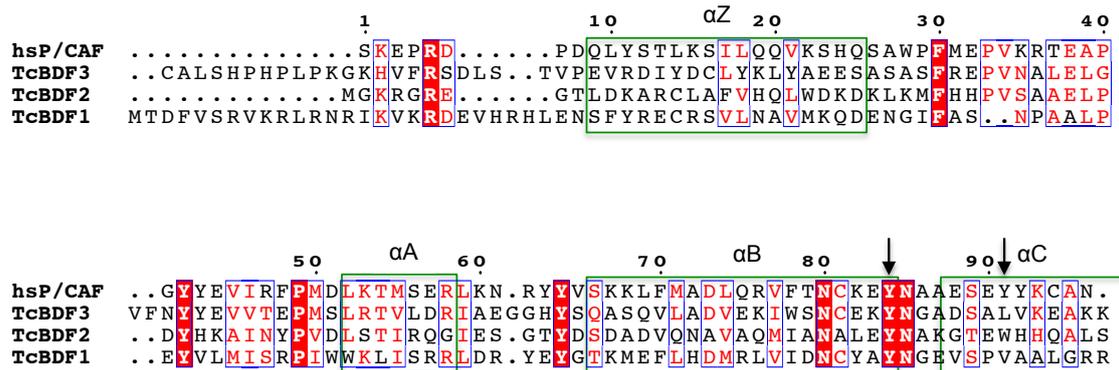


Figura 28: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de PCAF humano con los Factores con Bromodominio 1 a 3 de *Trypanosoma cruzi*. Los alineamientos se realizaron con el programa ClustalX y fueron curados manualmente y editados en el servidor ESPript. En verde se recuadran las alfa hélices correspondientes al bromodominio. En fondo rojo se indican los residuos conservados y con una flecha se indican los residuos mutados.

Para construir los mutantes puntuales se decidió utilizar la estrategia de ZOE-PCR previamente utilizada en nuestro laboratorio (Materiales y Métodos, figura 51). Se diseñaron los oligonucleótidos cebadores BDF3YxA Fw, BDF3YxA Rv, BDF3LxA Fw y BDF3LxA Rv, donde los codones que codifican para Y103 y L110 fueron reemplazados por codones que codifican para Alanina (A). Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector pCR2.1TOPO (Invitrogen) y secuenciados. Luego se clonaron por corte y ligación en el vector de entrada del sistema Gateway pENTR3C (Invitrogen) para luego ser clonados por

recombinación al vector pTcINDEX-GW (contruido durante este trabajo de Tesis) y el vector pDEST17 (Invitrogen).

III.2.3 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pTcINDEX-GW

La interferencia del ARN (iARN) es actualmente el método de elección para realizar análisis funcionales en *T. brucei* y se puede utilizar para inferir la función de determinados genes ortólogos de *T. cruzi* y *Leishmania*. Sin embargo, muchos genes de tripanosomatidos, a pesar de ser ortólogos a nivel de secuencia, poseen funciones específicas en cada una de las especies. *T. cruzi* no permite utilizar la estrategia de iARN debido a que carece de algunas de las enzimas de esa vía, específicamente el gen AGO1 (Ullu et al., 2004). Por eso se utilizan enfoques tales como la delección génica o la expresión de proteínas mutantes dominantes negativos. Sin embargo, tanto la delección de genes como la sobre-expresión de proteínas mutantes pueden producir un fenotipo letal no permitiendo realizar ensayos funcionales. El vector pTcINDEX permite la expresión inducible por tetraciclina en *T. cruzi* y su mayor ventaja es la posibilidad de expresar transgenes de manera controlada (Taylor & Kelly, 2006). Este sistema integrativo facilita de inducción de la expresión de genes específicos (mediante el agregado de tetraciclina) en un locus ribosomal transcripcionalmente silente de *T. cruzi*. Se utilizan líneas de *T. cruzi* que expresan constitutivamente la T7 RNA Polimerasa y los genes *tetR* desde un vector episomal llamado pLew13. Decidimos utilizar el pTcINDEX para estudiar el efecto de las mutaciones puntuales de *TcBDF3* en *Trypanosoma cruzi* pero primero convertimos este plásmido al sistema de clonado por recombinación Gateway® y optimizamos las condiciones de inducción y expresión en la cepa Dm28c.

El sistema Gateway® (Invitrogen) se basa en el clonado por recombinación sitio específica y de esta manera permite mover un gen de interés (clonado en un vector de entrada) a múltiples vectores de destino (Figura 29). Existe además, un sistema de conversión de vectores a este sistema (Gateway Vector Conversion System, Invitrogen) mediante el cual se introduce el “cassette Gateway” que permite el clonado por recombinación a través de la incorporación de las secuencias attR1 y attR2 en cualquier vector linealizado, junto con la secuencia CcdB y resistencia a Cloramfenicol para poder seleccionar los transformantes. Utilizamos este sistema para construir el vector de destino pTcINDEX-GW (Figura 30).

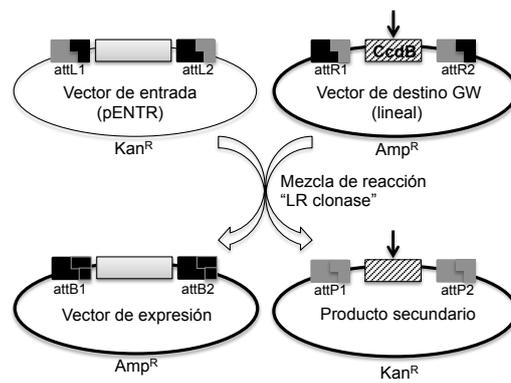


Figura 29: Esquema de clonado por recombinación del Sistema Gateway (Invitrogen). Las secuencias attL1 y attL2 presentes en el vector de entrada son reconocidas por las enzimas presentes en la mezcla de reacción "LR clonase", las cuales catalizan la recombinación con las secuencias attR1 y attR2 en el vector de destino. Se obtiene entonces un vector de expresión con la secuencia de interés (rectángulo gris claro) clonada previamente en el vector de entrada. Para aumentar la eficiencia de reacción se linealiza el vector de destino (flecha). Amp^R, resistencia al antibiótico Ampicilina; Kan^R, resistencia al antibiótico Kanamicina. La secuencia CcdB en el vector de destino permite la selección negativa ya que interfiere con la ADN girasa de *E. coli* inhibiendo el crecimiento en la mayoría de las cepas.

Para verificar que el sistema funcione y para optimizar las condiciones de crecimiento e inducción por tetraciclina en la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* se transfirió por recombinación la proteína fluorescente verde (a partir del vector de entrada pENTR3C-GFP construido en el laboratorio) al pTcINDEX-GW. Este vector fue utilizado para transfectar epimastigotes de la cepa Dm28c que contenía el plásmido pLew13.

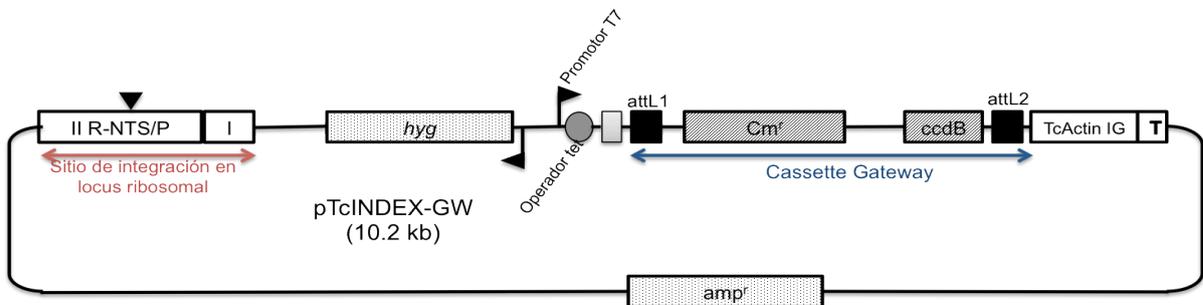


Figura 30: Mapa del vector pTcINDEX-GW. Se indican el sitio de integración en el locus ribosomal (R-NTS/P), el vector se linealiza entre los fragmentos I y II mediante una enzima de restricción (*SpeI*) y esto permite la integración del mismo. Hyg, resistencia al antibiótico Higromicina (selección en *T. cruzi*); amp^r, resistencia al antibiótico Ampicilina (selección en bacterias); TcActin IG, región intergénica de Actina; T, terminador transcripcional T7. El rectángulo gris claro al lado del cassette Gateway indica el sitio aceptor de splicing de la proteína P2 β ribosomal. Las banderas negras indican los promotores T7, se indican también la localización del operador tetraciclina (tet). El triángulo negro indica la localización del inicio de la transcripción de la Polimerasa I. El cassette Gateway está formado por los dos sitios de recombinación (attL1 y attL2), un gen de resistencia a cloranfenicol (Cm^r) y el gen ccdB (gen letal que solo permite la incorporación de este vector en cepas de *E. coli* que tiene la ADN girasa mutada).

Una vez obtenidos los parásitos transfectantes estables monitoreamos la expresión de la proteína fluorescente verde en cultivos inducidos con tetraciclina y sin inducir. Primero, se

realizaron curvas de crecimiento con distintas concentraciones de tetraciclina (Figura 31A). Como se puede observar en las tres condiciones ensayadas (0,05; 0,5 y 5 $\mu\text{g/ml}$) el crecimiento de los parásitos transfectantes es similar al de la cepa no inducida, siendo sus tiempos de duplicación semejantes. Luego, se detectó GFP mediante microscopía de fluorescencias y solo se observó expresión con el agregado de tetraciclina (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Como control de transfección se utilizaron parásitos Dm28c pLew13 transfectados con el vector pTcINDEX-Red que expresa de manera inducible una proteína fluorescente roja (RFP) (Figura 31B). En este caso pudimos observar una expresión basal de RFP en los cultivos no inducidos, indicando que este plásmido, sin el cassette Gateway, posee mayor escape en su sistema de regulación que el pTcINDEX-GW construido. Se decidió luego utilizar 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina para inducir los cultivos y realizar ensayos de western blot a distintos tiempos para evaluar la expresión de GFP en epimastigotes (Figura 31C). Pudimos observar que la cantidad de proteína aumenta al aumentar el tiempo de inducción, manteniéndose estable entre las 48 y 72 horas post-inducción.

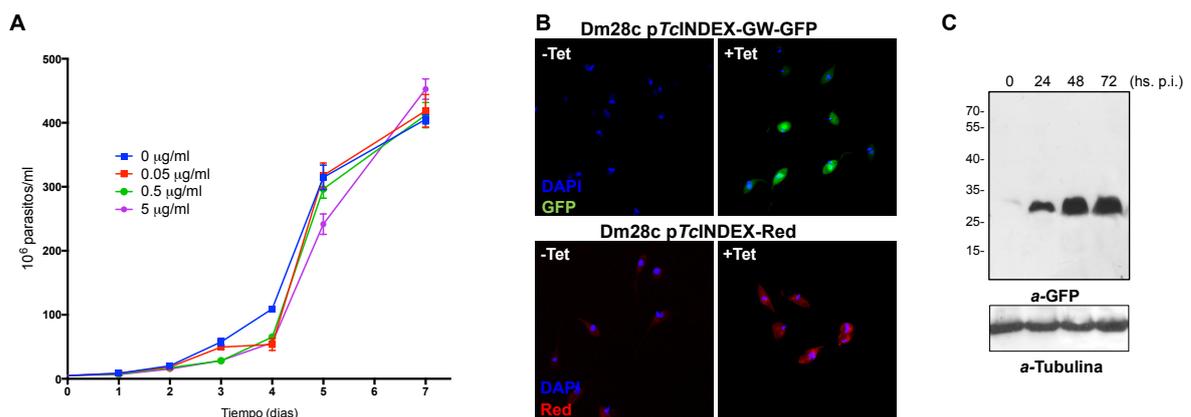


Figura 31: Caracterización de la línea Dm28c pTcINDEX-GW-GFP. A- Curvas de crecimiento con distintas concentraciones de tetraciclina (0-5 $\mu\text{g/ml}$). B- Microscopía de fluorescencia de epimastigotes Dm28c transfectados con pTcINDEX-GW-GFP y pTcINDEX-Red inducidos con tetraciclina (0,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 96 horas) y sin inducir. C- Ensayos de western blot en extractos totales de Dm28c pTcINDEX-GW-GFP inducidos con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ durante distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 horas). Se utilizaron anticuerpos anti-GFP (a-GFP) y anti- α -tubulina (a-Tubulina).

Con estos experimentos pudimos corroborar que las secuencias attB1 y attB2 generadas por recombinación no afectan la expresión de proteínas exógenas en *T. cruzi*. Aparentemente, este agregado hace al vector más eficiente ya que no observamos expresión de escape en la línea Dm28c pTcINDEX-GW-GFP. Luego, se realizaron ensayos de metaciclologénesis *in vitro* en medio TAU y se infectaron cultivos celulares de la línea Vero. Como se observa en la figura 32, la expresión de GFP se mantiene en todos los estadios del ciclo de vida.

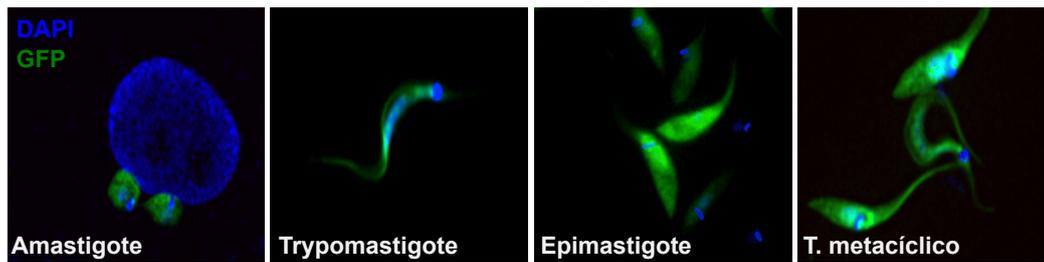


Figura 32: Microscopías de fluorescencia de Dm28c pTcINDEX-GW-GFP en distintos estadios del ciclo de vida. El núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI.

También probamos la inducción de la expresión de GFP al agregar tetraciclina al medio TAU de epimastigotes no inducidos, así como el agregado a células Vero infectadas por tripomastigotes no inducidos. Además, se indujeron tripomastigotes liberados de las células infectadas que no habían sido tratados previamente con tetraciclina. En todos los casos se observó expresión de GFP y una vez inducida, esta se mantuvo durante por lo menos una ronda de infección.

Estos ensayos nos permitieron estandarizar las condiciones de inducción por tetraciclina y expresión del pTcINDEX-GW en la cepa Dm28c tanto en epimastigotes como en infecciones *in vitro*.

III.2.4 SOBRE-EXPRESIÓN DE VERSIONES MUTANTES DE TcBDF3 EN EPIMASTIGOTES

Se obtuvieron distintas secuencias mutantes para TcBDF3 (todos como fusiones al epítipo de hemaglutinina, HA), se clonaron en el vector pTcINDEX-GW y se transfectaron epimastigotes de la cepa Dm28c pLew13. Los vectores construídos fueron:

- pTcINDEX-GW BDF3 HA (Salvaje)
- pTcINDEX-GW BDF3-L110A HA (Mutante puntual en L110)
- pTcINDEX-GW BDF3-Y103A HA (Mutante puntual en Y103)
- pTcINDEX-GW BDF3-L110A/Y103A HA (Doble mutante)

Se seleccionaron todas las líneas trasfectantes, pero los ensayos que se presentarán en esta parte del trabajo corresponden a los parásitos que sobre-expresan la proteína salvaje (BDF3HA) y la doble mutante, que de ahora en adelante se mencionará como BDF3mHA.

Para corroborar la correcta expresión de las proteínas en epimastigotes de *T. cruzi* realizamos ensayos de western blot (Figura 33A) e inmunofluorescencias (Figura 33B) con anticuerpos anti-HA en presencia de 0,5 µg/ml de tetraciclina durante 48 horas. Se puede observar una banda del peso molecular esperado para TcBDF3, detectando la proteína fusionada a HA solo en los cultivos inducidos con tetraciclina (no se observa expresión de

escape en los cultivos no inducidos). Además, al detectar *TcBDF3* tanto endógena como exógena con anticuerpos específicos observamos la sobre-expresión en los extractos provenientes de cultivos inducidos con tetraciclina. En las inmunofluorescencias se observó que la localización de ambas proteínas exógenas en epimastigotes era similar a la de *TcBDF3* endógena.

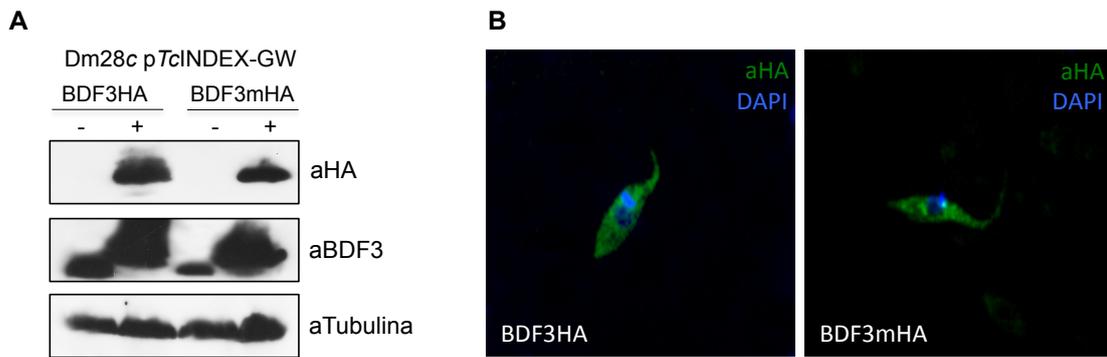


Figura 33: Expresión de BDF3HA y BDF3mHA en epimastigotes. A- Ensayos de western blot sobre extractos de Dm28c pTcINDEX-GW-BDF3HA y BDF3mHA. Se indujeron cultivos con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina durante 48 horas. Luego se colectaron y prepararon extractos proteicos totales. Se utilizaron anticuerpos anti-hemaglutinina (aHA), anti-*TcBDF3* (aBDF3) y anti- α -tubulina (aTubulina) como control de carga. B- Inmunofluorescencia de las líneas Dm28c pTcINDEX-GW-BDF3HA y BDF3mHA con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina durante 6 horas.

Luego se realizaron curvas de crecimiento de las líneas Dm28c pTcINDEX-GW-BDF3HA y BDF3mHA. En la figura 34A podemos ver que al inducir la expresión de la proteína salvaje no hay diferencias en el crecimiento con respecto a la línea no inducida. En cambio en los parásitos que sobre-expresan la proteína doble mutante vemos una disminución en el crecimiento a partir del día 4 y una detención completa del crecimiento a partir del día 7. Evidentemente este bromodominio es necesario para el crecimiento de *T. cruzi* aunque su rol biológico todavía no puede ser determinado con exactitud.

Previamente, con la construcción *TcBDF3 Δ C*, se determinó que la eliminación del extremo C-terminal de *TcBDF3* producía una disminución en la tasa de metaciclogénesis *in vitro* en los parásitos transfectados. Realizamos los mismos ensayos de metaciclogénesis en medio TAU con las líneas Dm28c pTcINDEX-GW BDF3HA y BDF3mHA y observamos una disminución en el porcentaje de tripomastigotes metacíclicos al inducir con tetraciclina ambas (Figura 34B). Llamativamente, los parásitos que sobre-expresan la versión doble mutante pierden casi completamente su capacidad de realizar metaciclogénesis. Es importante aclarar que estos ensayos se realizan incubando los epimastigotes durante 96 horas en medio TAU3AAG y como se observa en las curvas de crecimiento, no hay diferencias en el crecimiento de las líneas inducidas y sin inducir a estos tiempos. Esto

indica que la disminución en la tasa de metaciclógenesis es un efecto de la sobre-expresión de las proteínas exógenas y no debido a un defecto en el crecimiento de los epimastigotes.

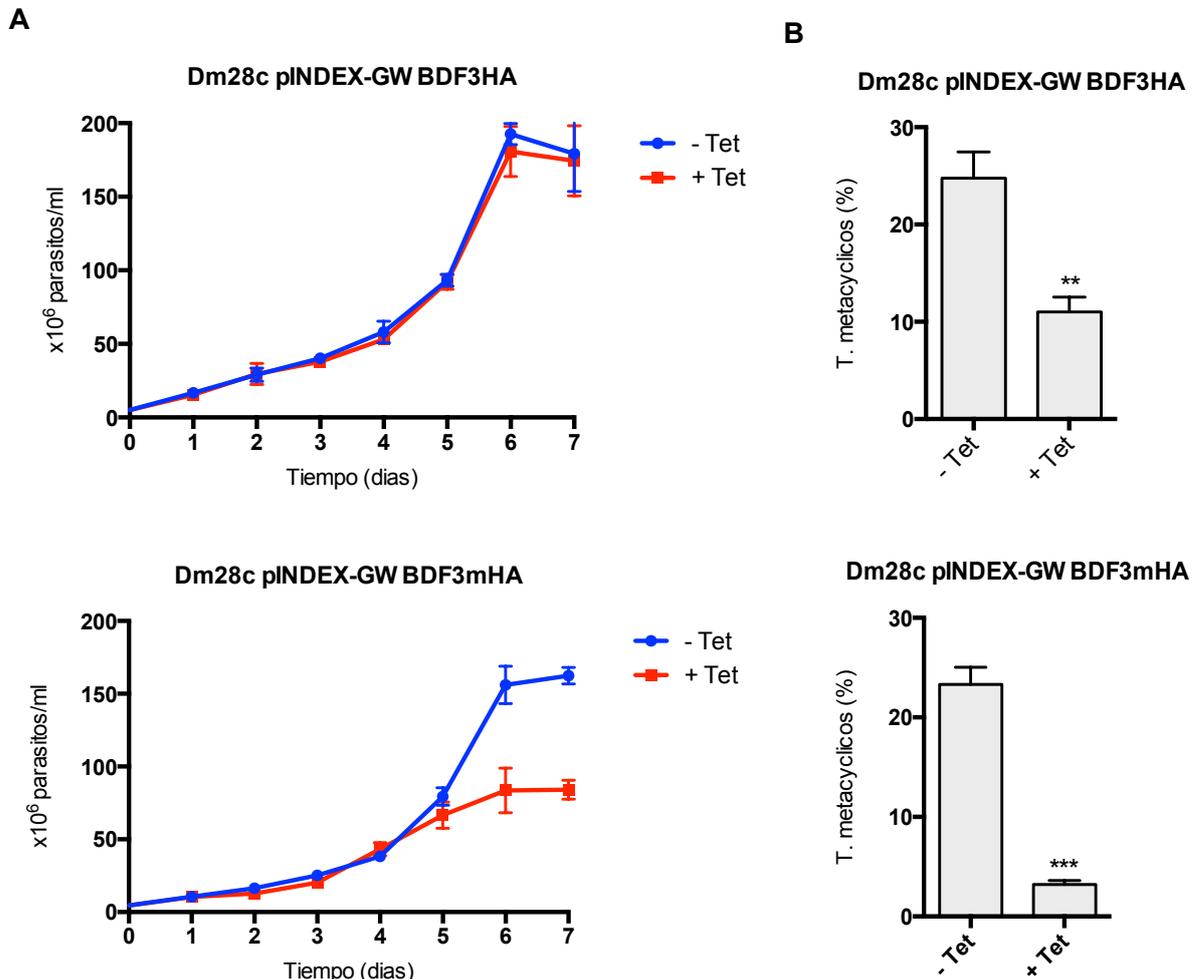


Figura 34: Sobre-expresión de BDF3HA y BDF3mHA en epimastigotes. A- Curvas de crecimiento de las líneas Dm28c pTcINDEX-GW-BDF3HA y BDF3mHA inducidas con 0,5 μ g/ml de tetraciclina durante 7 días. B- Ensayo de metaciclógenesis *in vitro* con medio TAU de las distintas líneas después de 96 horas de incubación. Se utilizó 0,5 μ g/ml de tetraciclina y los tripomastigotes metacíclicos se contaron en preparados teñidos con el colorante Giemsa. Las barras de error representan el desvío estándar de tres experimentos independientes. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$.

III.2.5 EXPRESIÓN DE BDF3- Y103A/L110A RECOMBINANTE PARA ENSAYOS *IN VITRO*

Como ya se detalló en el capítulo anterior, realizamos ensayos de Far western blot con péptidos sintéticos de tubulina y tubulina acetilada para corroborar la interacción entre TcBDF3 y la tubulina acetilada (Figura 23). Para evaluar si la proteína TcBDF3 mutante pierde la capacidad de unir tubulina acetilada decidimos expresar TcBDF3mHA como fusión a poli-histidina en *E. coli* a partir del vector pDEST17 para luego purificarla y utilizarla en ensayos *in vitro* con los péptidos sintéticos.

La secuencia de interés fusionada al epítipo de hemaglutinina (en el vector de entrada pENTR3C) se clonó por recombinación en el vector de destino del sistema Gateway pDEST17 (que agrega una cola de 6 histidinas) y se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante el agregado de IPTG en la cepa de *E. coli* BL21 pLys. Se ensayaron distintas concentraciones de IPTG, distintas temperaturas y distintos tiempos de inducción. En todos los casos observamos sobreexpresión de la proteína recombinante de manera insoluble y se obtuvo mayor cantidad de proteína recombinante induciendo con 0,1 mM IPTG durante 16 hs (ON) a 25 °C. Decidimos utilizar estas condiciones y purificar la proteína recombinante a partir de cuerpos de inclusión. En la tesis doctoral de la Dra. Vanina Villanova se purificó, con buen rendimiento, TcBDF3-his (sin epítipo de HA) a partir de cuerpos de inclusión mediante solubilización con Glicina-NaOH pH 11 y dialisis contra tampón fosfato 100 mM pH 8. En este trabajo se modificó el protocolo agregando dos pasos de lisis celular mediante un homogeneizador de alta presión y lavado de los cuerpos de inclusión con agua destilada y Triton X-100.

Luego de la solubilización de TcBDF3 salvaje y doble mutante con tampón Glicina-NaOH pH 11 las mismas fueron dializadas contra tampón fosfato 100 mM pH 8. En la figura 35A se observan BDF3HA-his y BDF3mHA-his luego de la solubilización a pH11 y su posterior diálisis. Las proteínas recombinantes luego fueron cuantificadas y su estructura secundaria se evaluó mediante dicroísmo circular (Figura 35B). Los datos de elipticidad arrojados fueron convertidos a elipticidad molar y graficados obteniéndose un espectro característico de proteínas con estructura secundaria hélice alfa. Se observa que ambos espectros se superponen perfectamente lo que indica que las mutaciones introducidas en TcBDF3 no alteran su estructura secundaria. Estos espectros concuerdan con los obtenidos por la Dra. Vanina Villanova para TcBDF3 recombinante sin el epítipo HA.

A continuación, se repitieron los ensayos de far westen blot con péptidos sintéticos de tubulina y tubulina acetilada en la K40 y ambas proteínas recombinantes (salvaje y doble mutante). En este caso se detectó la proteína unida mediante anticuerpos anti-HA, como control también se utilizaron anticuerpos anti-Histidina obteniéndose el mismo resultado. Como podemos observar, aunque TcBDF3 doble mutante es capaz de plegarse y tiene una estructura secundaria similar a la de la versión salvaje, la eliminación de los residuos Y103 y L110 no permite que el bromodominio se una a su ligando acetilado (Figura 35C), ya que no se observa señal al incubar el péptido de tubulina acetilada con BDF3mHA-his.

Las proteínas recombinantes obtenidas (salvaje y mutante) también fueron utilizadas para determinar la capacidad de unión de inhibidores de bromodominios comerciales, como se explicará en el siguiente capítulo.

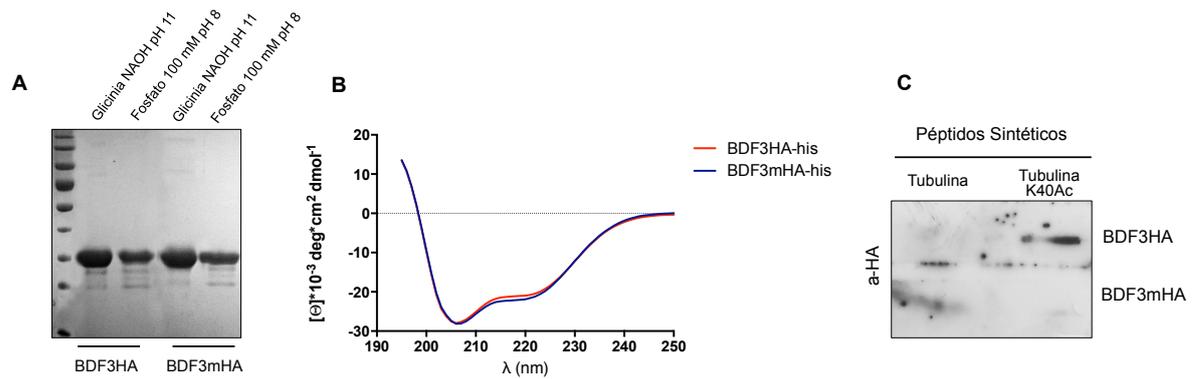


Figura 35: Expresión de una versión doble mutante de *TcBDF3* recombinante. A- SDS-PAGE teñido con el colorante Coomassie de BDF3HA-his y BDF3Y103A/L110A-HA-his purificada a partir de cuerpos de inclusión solubilizada con Glicina-NaOH 100 mM pH 11 (calle 1 y 3) y luego de la diálisis contra buffer fosfato 100 mM pH 8 (calle 2 y 4). B- Espectros de dicroísmo circular de BDF3HA-his y BDF3-Y103A/L110A-HA-his en tampón fosfato 100 mM pH 8. Se graficaron los datos de elipticidad molar ($[\theta]$) en función de la longitud de onda (nm). C- Ensayo de far western blot. Se adhirieron péptidos sintéticos de tubulina α acetilada (Tubulina K40Ac) y sin acetilar (Tubulina) en membranas de nitrocelulosa y luego se incubaron con BDF3HA (salvaje) y BDF3mHA (doble mutante) recombinantes. La proteína adherida se detectó mediante western blot con anticuerpos anti-HA (a-HA).

III.2.6 SOBRE-EXPRESIÓN DE VERSIONES MUTANTES DE *TcBDF3* EN INFECCIONES *IN VITRO*

Para estudiar si la expresión *TcBDF3* era importante para la infectividad de tripomastigotes y para la replicación intracelular de amastigotes realizamos ensayos de infección *in vitro* con células Vero. Los tripomastigotes se pre-incubaron durante tres horas en presencia de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina y luego se utilizaron para infectar células Vero en una relación 10:1. Luego de seis horas de infección, los tripomastigotes libres se lavaron y se agregó medio fresco. Luego de 48 horas se fijaron las células, se tiñieron con el colorante Giemsa y se cuantificó el porcentaje de células infectadas (Figura 36A) y la cantidad de amastigotes por célula infectada (Figura 36B).

Al sobre-expresar la proteína salvaje colocando la Tet durante la pre-incubación de los tripomastigotes y en el medio fresco observamos una disminución del porcentaje de células infectadas. Por otro lado, al incubar con Tet solo en el medio fresco (luego del lavado de los tripomastigotes del sobrenadante), no se ve afectado el número de amastigotes intracelulares. En cambio al sobre-expresar la versión doble mutante en las mismas condiciones vemos un aumento en el porcentaje de células infectadas, sin modificación en la cantidad de amastigotes. Como control, contamos la cantidad de células por campo, siendo este valor consistente en las condiciones inducidas y sin inducir.

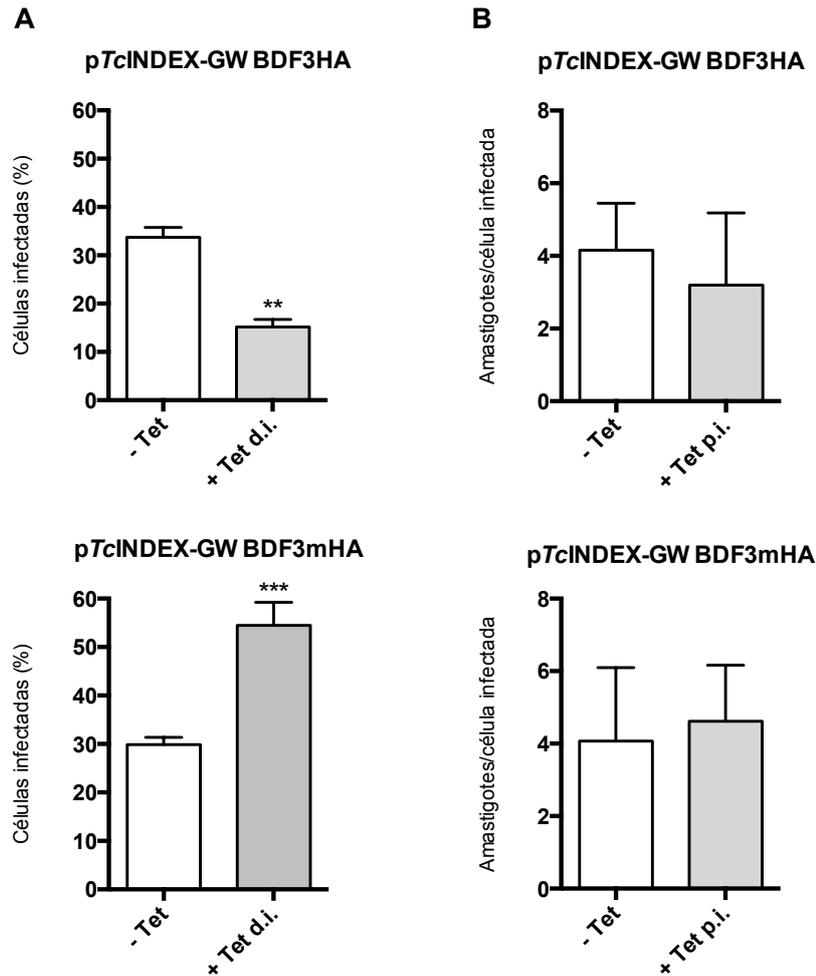


Figura 36: Infecciones en células Vero. A- Se cuantificó el porcentaje de células infectadas utilizando tripomastigotes Dm28c pTcINDEX-GW BDF3HA y BDF3mHA pre-incubados con tetraciclina 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Este antibiótico se mantuvo en el medio durante todo el ensayo (condición Tet d.i., durante infección). En la condición -Tet no se agregó antibiótico en ningún momento. B- Cuantificación del número de amastigotes por célula infectada. Se agregó tetraciclina solo en el medio fresco luego de retirar los tripomastigotes (condición Tet p.i., post infección). ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$.

Para corroborar la sobre-expresión de las construcciones en los distintos estadios se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos anti-HA en los amastigotes obtenidos luego de incubar post-infección con tetraciclina por 48 horas (Figura 37A) y en tripomastigotes pre-incubados con tetraciclina por 2 horas (que luego se utilizaron para infectar) (Figura 37B). En ambos casos observamos una localización que se corresponde con lo observado al utilizar anticuerpos específicos anti-TcBDF3 en parásitos salvajes en tripomastigotes y amastigotes. Por otro lado, corroboramos la expresión de la proteínas exógenas en tripomastigotes mediante western blot sobre extractos totales con anticuerpos anti-HA (Figura 7C). Al igual que en epimastigotes solo se observó sobre-expresión al

incubar los tripomastigotes con tetraciclina (en este caso la inducción se realizó durante 24 horas).

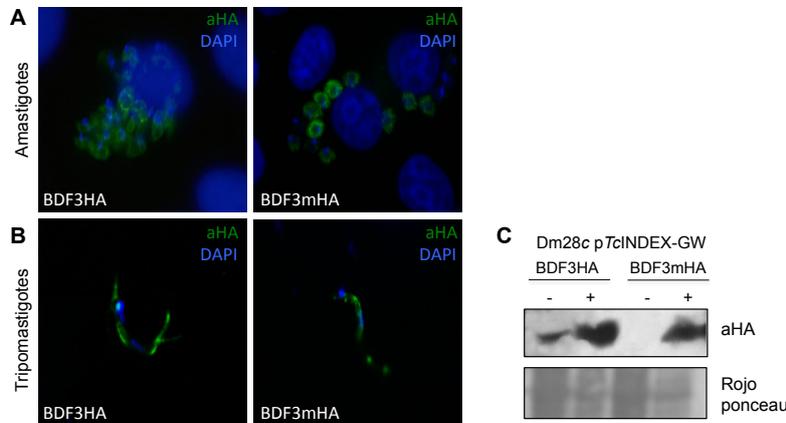


Figura 37: Expresión de *TcBDF3HA* y *TcBDF3mHA* en amastigotes y tripomastigotes transfectantes. A- Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-HA sobre amastigotes inducidos con tetraciclina. B- Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-HA sobre tripomastigotes transfectantes. Como anticuerpo secundario se utilizaron anticuerpos anti-rata acoplados a FITC. El ADN se marcó con DAPI. C- Western blot sobre extractos totales de tripomastigotes sin inducir (-) e inducidos (+) con tetraciclina (0,5 µg/ml). Se utilizaron anticuerpos anti-HA y como control de carga se muestra la membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau S.

III.2.7 DISCUSIÓN GENERAL

El proceso de diferenciación que sufre *Trypanosoma cruzi* durante su ciclo de vida es complejo e involucra diversos cambios en los perfiles transcripcionales y traduccionales, en el metabolismo, en la superficie del parásito que protege a los tripomastigotes metacíclicos de la respuesta inmune del huésped, así como un remodelado extenso del citoesqueleto. Es muy importante la presencia continua de estructuras microtubulares del citoesqueleto a lo largo de estos procesos. Los resultados obtenidos durante este trabajo indican que el bromodominio es importante para la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes pero, aparentemente, *TcBDF3* no sería importante para la replicación intracelular de los amastigotes. En *T. brucei* se han identificado proteínas asociadas al citoesqueleto que muestran patrones de expresión dependientes del ciclo de vida. Algunas de ellas son específicas de determinado estadio, como CAP15 y CAP17 que estabilizan los microtubulos y su expresión está regulada durante el ciclo de vida (Vedrenne et al., 2002). Por otro lado, hay evidencia que algunos componentes de la zona de unión al flagelo (FAZ) están reguladas de la misma manera y en particular FLA3 es crucial para la adhesión del flagelo pero solo se expresa en la forma sanguínea de *T. brucei* (Woods et al., 2013). Aunque el rol de *TcBDF3* en *Trypanosoma cruzi* sigue siendo desconocido, los resultados obtenidos hasta

el momento nos permiten pensar que podría tener una participación activa en la modulación del citoesqueleto durante el paso entre los distintos estadios del ciclo de vida.

La invasión de la célula huésped por *Trypanosoma cruzi* es un paso crítico para el establecimiento de la infección en el huésped mamífero. Este paso consta de diferentes eventos que involucran al parásito y al huésped, lo que lleva a una activación de distintas vías de transducción de señales en ambos (Yoshida, 2006). Los cambios que observamos en las tasas de infección al utilizar líneas que sobre-expresan *TcBDF3* salvaje o mutante nos permiten postular que el bromodominio podría tener un rol en la infección, activando o modulando, vías de regulación dependiente de acetilación.

Pensamos que es fundamental la caracterización del resto de las proteínas con bromodominio presentes en este protozoo. Además, sería muy interesante, tomando como punto de partida la interacción tubulina acetilada-bromodominio, poder aportar información sobre el rol regulatorio de esta modificación post-traducciona en la dinámica de citoesqueleto.

III.3 EVALUACIÓN DE INHIBIDORES DE BROMODOMINIOS SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

En este último capítulo se describirán los resultados obtenidos al ensayar el efecto de distintos inhibidores de bromodominios sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y su capacidad de unirse a TcBDF3 recombinante.

III.3.1 INTERACCIÓN DE TcBDF3 CON EL INHIBIDOR iBET-151

En los últimos cinco años se han desarrollado diversos inhibidores de bromodominios. Uno de ellos, desarrollado por GlaxoSmithKline, es el iBET-151 o GSK1210151A que fue cedido a nuestro grupo para evaluar su actividad en *Trypanosoma cruzi*.

Este compuesto es un derivado de quinolina isoxazoles y se ha demostrado que interacciona con el bromodominio N-terminal de la proteína BRD2 humana y es capaz de unirse al bolsillo de reconocimiento de la lisina acetilada. En el trabajo de Seal y colaboradores se obtuvo la estructura del bromodominio N-terminal de BRD2 unida al iBET-151 mediante difracción de rayos X. Esta estructura (Figura 38) reveló que un átomo de N del iBET acepta un puente hidrógeno del grupo hidroxilo de la tirosina 113 (Y113) de BRD2. También existe una interacción polar entre el oxígeno del isoxazol y el grupo amina de la cadena lateral de la asparagina 156 (N156). Los dos grupos metilo del iBET ocupan dos pequeños bolsillos hidrofóbicos, uno en la región de la fenilalanina 99 (F99) y otro cerca de la leucina 110 (L110). Además, el anillo quinolínico se une a una grieta hidrofóbica entre un triptófano (W97) y prolina (P98) de un lado y una leucina (L108) del otro. Ese triptófano y esta prolina son parte del motivo WPF presente en bromodominios de la familia BET. Por otro lado, el grupo 4-anilina se une a la región denominada “estante WPF” formado por las cadenas laterales del W97 y la isoleucina 162 (I162) y el grupo metileno de la asparagina 161 (N161). Se postula que la interacción lipofílica entre el estante WPF y el inhibidor contribuye a la afinidad de unión de muchos inhibidores de bromodominios BET (Seal et al., 2012). Por ejemplo, esta interacción también se ha reportado para las benzodiazepinas (Chung et al., 2011) y las fenil lisoxasol sulfonamida (Bamborough et al., 2012) que tienen esta actividad. Todos los residuos involucrados directamente en estas interacciones están altamente conservados en todos los bromodominios de la familia BET.

Decidimos comparar la secuencia aminoacídica de TcBDF3 con la de BRD2 humano para evaluar si los aminoácidos involucrados en la interacción con el iBET-151 estaban conservados.

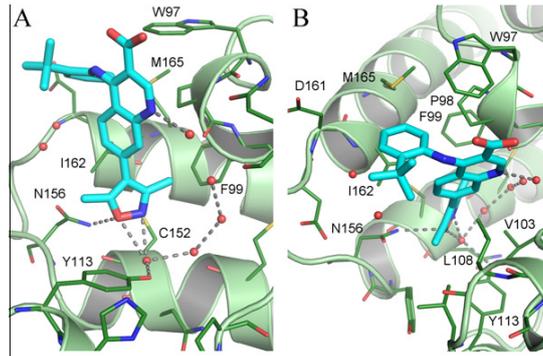
Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de proteínas no nucleares en Trypanosoma cruzi

Figura 38: Vistas alternativas (A y B) de la estructura cristalina del iBET con el bromodominio N-terminal de BRD2 humano. Se indican los aminoácidos importantes para la interacción con el inhibidor. Adaptado de Seal et al, 2012.

Como puede observarse en la figura 39, las alfa hélices correspondientes a ambos bromodominios pueden ser correctamente alineadas. Se comparó la estructura obtenida por difracción de rayos X de BRD2 (PDB: 1X0J) con la predicción de estructura secundaria de *TcBDF3* obtenida por el servidor Jpred3 (Cole et al., 2008) (parte inferior y superior del alineamiento respectivamente). Los residuos de BRD2 que interactúan con el iBET-151 están en su mayoría conservados en *TcBDF3*, por ejemplo la prolina 98, la leucina 108, la tirosina 113 y la asparagina 156 (residuos sombreados de gris y recuadrados en negro en la figura 39). En cambio no encontramos en *TcBDF3* el motivo WPF característico de los bromodominios BET humanos. En tripanosomátidos solo la fenilalanina (F) de este motivo se encuentra conservada. En particular, en *TcBDF3* encontramos una alanina y una serina en el lugar del triptófano y la prolina del motivo WPF. Al comparar con otros bromodominios humanos no encontramos esta combinación de aminoácidos pero si vemos que en esa región correspondiente al loop ZA hay presentes gran cantidad de serinas en el resto de los bromodominios no-BET. Por otro lado, la estructura secundaria predicha para *TcBDF3* corresponde con al estructura cristalográfica de BRD2 humana.

Para determinar si el iBET-151 se une efectivamente a *TcBDF3* realizamos ensayos de desactivación o “quenching” de la fluorescencia. Se considera que las proteínas tienen fluorescencia intrínseca debido a la presencia de aminoácidos aromáticos: triptófano (W), tirosina (Y) y fenilalanina (P). La mayoría de las emisiones fluorescentes intrínsecas de una proteína plegada se deben a la excitación de los residuos de W, con algunas emisiones debido a la Y y P. El triptófano tiene una longitud de onda máxima absorción de 280 nm y un pico de emisión que va desde 300 a 350 nm dependiendo de la polaridad del medio ambiente. Entonces, la disminución en la emisión de fluorescencia de los triptófanos puede utilizarse para determinar el estado conformacional de una proteína así como cambios en la polaridad del ambiente por la presencia de ligandos específicos.

Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de proteínas no nucleares en *Trypanosoma cruzi*

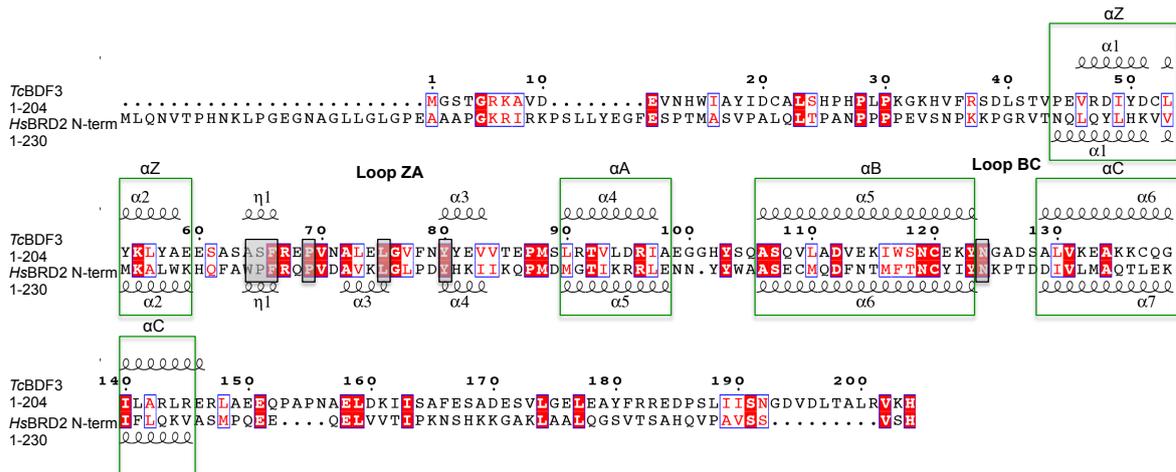


Figura 39: Apilamiento de la secuencia aminoacídica de BRD2 humano (*Homo sapiens*, P25440) y *TcBDF3* (TcCLB.510719.70) mediante el programa ClustalX. Luego, mediante el servidor ESPript 3.0 se ubicaron las regiones de estructura secundaria predichas para *TcBDF3* por el servidor Jpred3 (parte superior del alineamiento) y la estructura secundaria de BRD2 obtenida por difracción de rayos X (PDB: 1X0J) (parte inferior del alineamiento). Se indican las regiones αZ , αA , αB y αC características del bromodominio recuadradas en verde. Se indican los bucles o “loops” ZA y BC. Los aminoácidos de BRD2 importantes para la interacción con el iBET-151 están recuadrados en negro y sombreados en gris. Los aminoácidos conservados se indican en color blanco y fondo rojo. Las sustituciones conservadas se indican en rojo con fondo blanco.

TcBDF3 posee un triptófano en la región de la hélice αB que se encuentra en las cercanías de aminoácidos clave para la interacción con iBET-151 predicha. Entonces, realizamos espectros de fluorescencia a 24°C de *TcBDF3*-his recombinante a una concentración fija (5 μM) con el agregado de distintas concentraciones de inhibidor (1 a 10 μM) (Figura 40). Se puede ver en la figura 39 que la intensidad de fluorescencia disminuye regularmente al aumentar la concentración de iBET-151. Esto sugiere que la droga interacciona con *TcBDF3* y que está desactivando la fluorescencia intrínseca de la proteína.

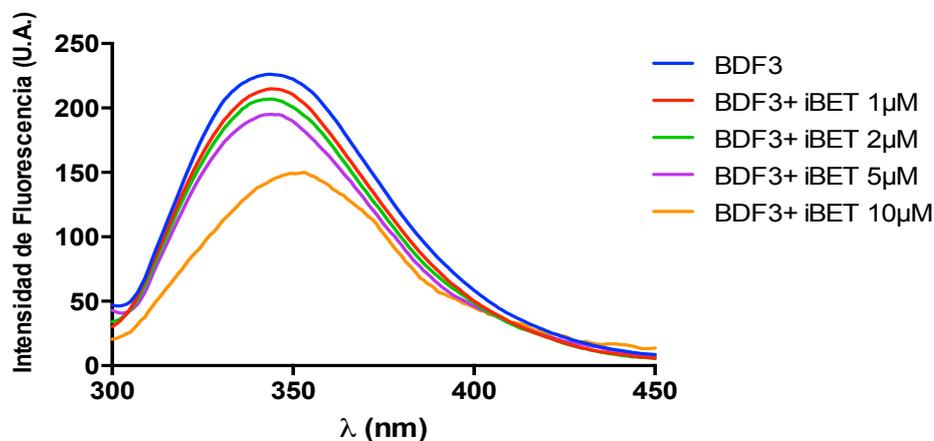


Figura 40: Espectros de emisión de fluorescencia de *TcBDF3* (5 μM) con distintas cantidades de iBET-151. Se excitó a 295 nm y se registraron emisiones de fluorescencia entre 290 y 490 nm.

La desactivación de la fluorescencia puede proceder a través de diferentes mecanismos que se clasifican en dinámicos y estáticos. En la desactivación estática se forma un complejo no fluorescente entre el fluoróforo y el compuesto “desactivador”. En la desactivación dinámica o colisional, el compuesto “desactivador” difunde hacia el fluoróforo durante la vida media su estado excitado y, luego del contacto, el fluoróforo retorna al estado basal sin emitir fotones. El mecanismo dinámico puede describirse a través de la ecuación de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q]$$

Donde F_0 y F corresponden a las intensidad de fluorescencia de TcBDF3-his en ausencia y presencia de iBET-151 respectivamente. La constante de quenching de Stern-Volmer, K_{sv} , es una medida de la eficiencia de quenching y $[Q]$ es la concentración de iBET-151. Al graficar F_0/F versus $[Q]$ (Figura 41) observamos una desviación negativa hacia el eje x.

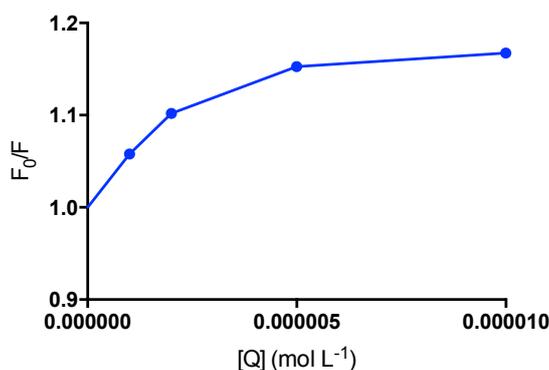


Figura 41: Gráfico de Stern-Volmer de TcBDF3-his (5 μ M) a 24°C en presencia de iBET-151 (1,2,5 y 10 μ M).

Este tipo de gráfico es característico de la desactivación de la fluorescencia de proteínas por compuestos polares o cargados. Un gráfico de Stern-Volmer lineal es generalmente indicativo de la presencia de una sola clase de fluoróforos, todos igualmente accesibles al compuesto desactivador. Si hay dos poblaciones de fluoróforos, y una clase no es accesible al desactivador, entonces observamos desviaciones hacia el eje x. Este resultado coincide con la presencia de dos triptofanos en TcBDF3, uno dentro del bolsillo hidrofóbico y otro en el extremo N-terminal, fuera de la región del bromodominio. Luego, utilizamos la ecuación de Stern-Volmer modificada para obtener la constante de unión y el número de sitios de unión:

$$F_0/(F_0 - F) = 1/(f_a K_a [Q])$$

donde f_a es la fracción de TcBDF3 accesible al solvente y K_a es la constante de desactivación efectiva para la fracción accesible. Estos valores se obtuvieron a partir de la gráfica $F_0/(F_0 - F)$ versus $1/[Q]$ (Figura 42).

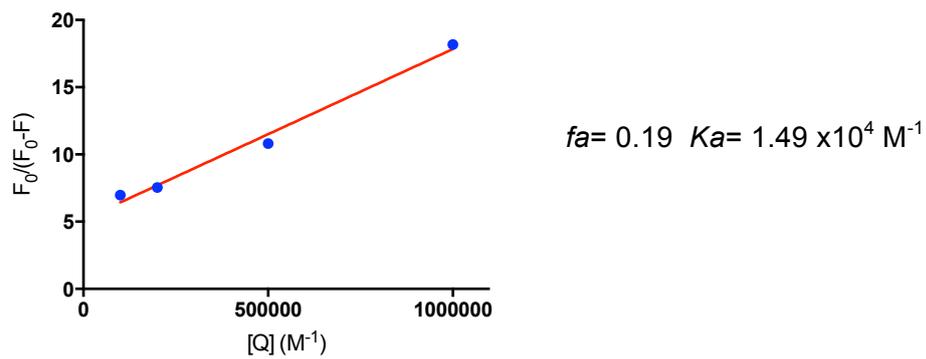


Figura 42: Gráfica de Stern-Volmer modificada para TcBDF3 a 24°C en presencia de distintas concentraciones de iBET-151.

El mecanismo estático y dinámico puede distinguirse por la dependencia de las constantes en función de la temperatura, la viscosidad o los tiempos de vida media. Para distinguir que tiempo de mecanismo estaba ocurriendo, repetimos los espectros a mayor temperatura (35°C) y obtuvimos una $Ka=1.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Esta dependencia positiva es indicativa de un mecanismo de quenching dinámico. Luego, realizamos los espectros de absorción UV-visibles de TcBDF3, iBET-151 y de la mezcla de ambos. Este método sencillo permite determinar si ocurren cambios estructurales al formarse el complejo. El complejo formado por un mecanismo estático presente un espectro UV-visible diferente a la sumatoria de los espectros obtenidos por separado. Como podemos ver en la figura 43, el espectro no cambia al formarse el complejo, lo que indica de nuevo, que estamos en presencia de un mecanismo dinámico.

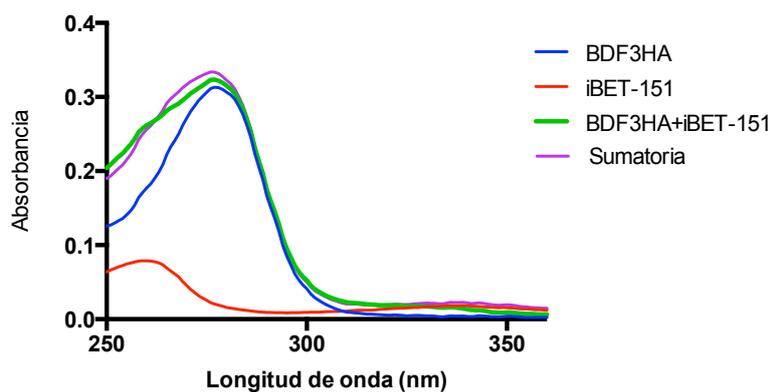


Figura 43: Espectro de absorción UV-visible de TcBDF3-his (1 μM), iBET-151 (10 μM), la mezcla de ambos y la superposición matemática de TcBDF3 e iBET-151 (Sumatoria).

Paralelamente, realizamos los mismos ensayos con el doble mutante de *TcBDF3* para determinar si esta versión que tiene la Y103 y L110 cambiados por alanina es capaz de interactuar con el inhibidor. La Y103 mutada está ubicada adyacente a la asparagina conservada que en BDF2 humana es necesaria para la interacción con iBET-151. En la figura 44 se muestra el espectro de fluorescencia obtenido, donde podemos ver que se forma algún tipo de complejo, lo que se refleja en una disminución en la emisión de fluorescencia al agregar la concentración menor de iBET-151 pero al agregar concentraciones mayores de inhibidor no se ven diferencias en las intensidades máximas.

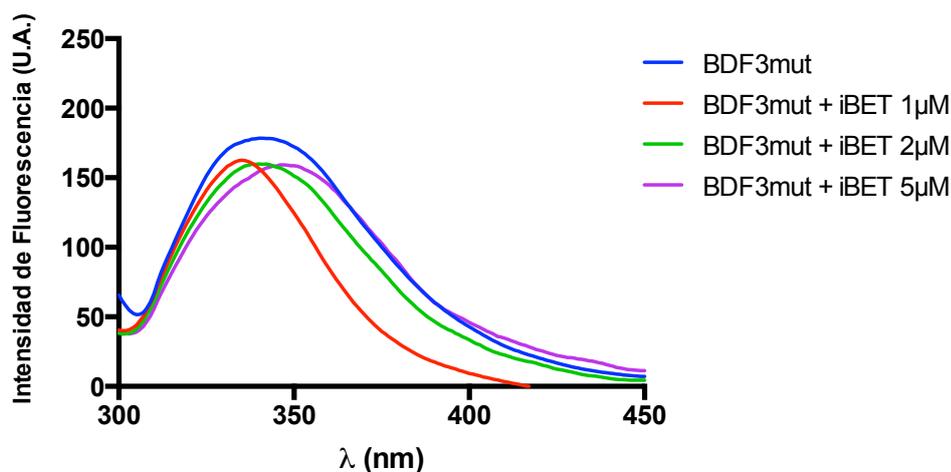


Figura 44: Espectros de emisión de fluorescencia de *TcBDF3m-his* (5 μ M) con distintas cantidades de iBET-151. Se excitó a 295 nm y se registraron emisiones de fluorescencia entre 290 y 490 nm.

Además, obtuvimos el espectro UV-visible de BDF3 doble mutante y del complejo con iBET-151 y observamos que la sumatoria de los espectros por separado es distinta al del complejo, lo que indicaría la formación de un complejo estático (Figura 45).

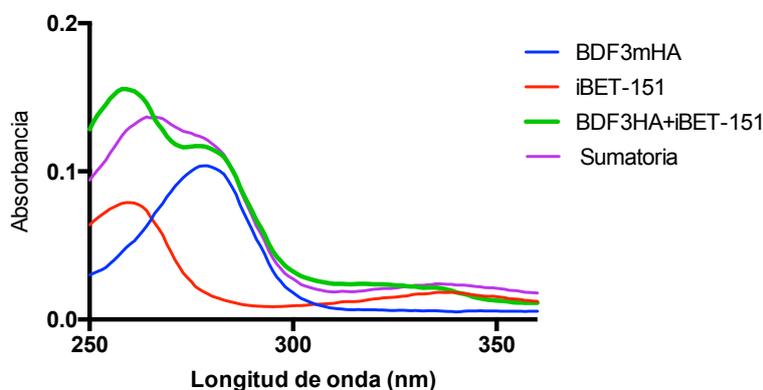


Figura 45: Espectro de absorción UV-visible de *TcBDF3m-his* (1 μ M), iBET-151 (10 μ M), la mezcla de ambos y la superposición matemática de *TcBDF3* e iBET-151 (Sumatoria).

Esto no da la idea de que iBET-151 no puede unirse específicamente al bolsillo hidrofóbico de la proteína mutada sino que parece más bien algún tipo de unión inespecífica.

III.3.2 EFECTO DE IBET-151 SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Luego decidimos probar si el iBET-151 tenía algún efecto sobre el crecimiento de epimastigotes y se realizaron curvas de crecimiento de epimastigotes de la cepa Dm28c con distintas concentraciones de inhibidor (0 a 24 μM). Podemos observar en la figura 46 que a partir de 2,4 μM hay una disminución en el crecimiento y a partir de los 12 μM de iBET-151 esta disminución es más notable.

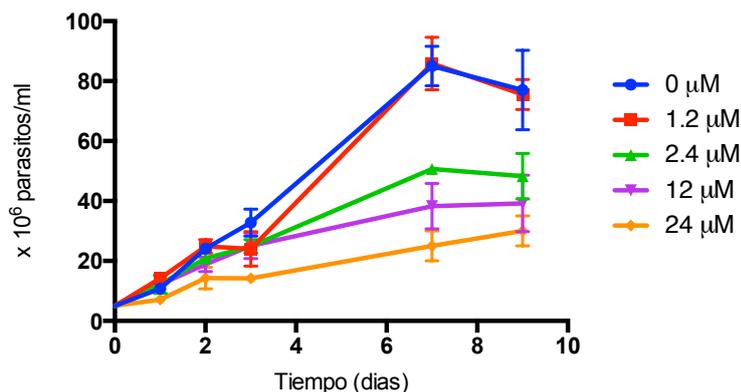


Figura 46: Curva de crecimiento de epimastigotes de la cepa Dm28c a distintas concentraciones de iBET-151. Se cuantificó la cantidad de parásitos durante 9 días.

Se calculó también la concentración inhibitoria media (CI_{50}) luego de 3 días de incubación con el inhibidor (Figura 47). El valor calculado (5 μM) es comparable al del Benznidazol, la droga tripanosida usada generalmente como referencia que posee un CI_{50} en epimastigotes de aproximadamente 8 μM .

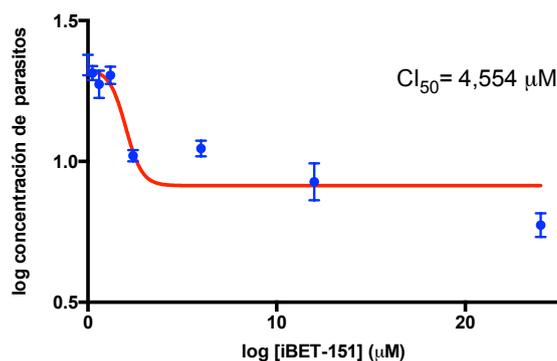


Figura 47: Cálculo del valor de CI_{50} para el iBET-151 sobre epimastigotes de la cepa Dm28c. Se graficó el logaritmo de la concentración de parásitos a los 3 días para el logaritmo de cada concentración de iBET-151 utilizada. Luego se realizó un ajuste no paramétrico de la curva para obtener el valor de concentración inhibitoria media.

Posteriormente realizamos ensayos de metaciclologénesis *in vitro* con el inhibidor en medio TAU. Probamos las concentraciones más bajas (entre 0,24 y 2,4 μM) ya que en la curva de crecimiento observamos que el crecimiento no se veía afectado en estas condiciones y así

distinguir si el efecto se debe solamente a un impedimento en la diferenciación. En la figura 48 podemos ver que solo a la concentración mas alta se observa una disminución significativa en el número de tripomastigotes metacíclicos.

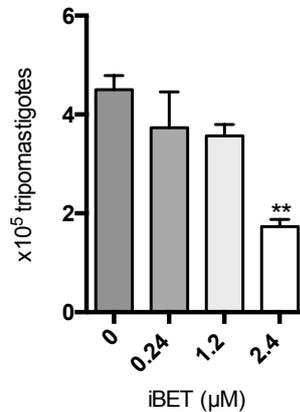


Figura 48: Ensayo de metaciclogénesis *in vitro* en medio TAU durante 96 horas con iBET-151 (0-2,4 μM). ** p<0,05.

Finalmente, se evaluó la citotoxicidad del iBET-151 en células Vero y su capacidad de inhibir la infección *in vitro* en estas células. Se determinó que el compuesto no era citotóxico en las condiciones de infección ensayadas (hasta 10 μM). En los ensayos de infección *in vitro* (sobre células Vero) se observó una disminución significativa en el número de células infectadas realizando el tratamiento tanto durante la infección como post-infección (a partir de 2,4 μM). El número de amastigotes por célula no se modificó significativamente en ninguna condición. Estos resultados fueron obtenidos por la Dra. Romina Manarin de la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.

El iBET-151 es un inhibidor específico del segundo bromodominio de la proteína humana BDF2 y fue descubierto por su capacidad de regular positivamente a la Apolipoproteína A1 (ApoA1). ApoA1 es el componente mayoritario de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL, de sus siglas en inglés “High Density Lipoprotein”). Se ha correlacionado un aumento del colesterol HDL con una disminución en el riesgo de padecer arterosclerosis y la sobre-expresión de ApoA1 es uno de los enfoques utilizados en la actualidad para el desarrollo de nuevas terapias contra esta enfermedad (Wong, 2007). Se demostró que el iBET-151 antagonizaba con la interacción proteína-proteína entre bromodominios de la familia BET e Histonas acetiladas reconociendo específicamente el bolsillo de unión y era a través de este mecanismo por el cual se aumentaba la expresión de ApoA1. Además, este compuesto tiene un amplio perfil anti-inflamatorio observado en un modelo experimental de ratón (Mirguet et al., 2012). En la actualidad, existe una gran cantidad de inhibidores de

bromodominios utilizados para tratar diversas enfermedades. Uno de ellos, el iBET-762 desarrollado por GlaxoSmithKline, se encuentra en prueba clínica fase I/II para el tratamiento de un carcinoma epitelial de origen genético.

Esta claro que los inhibidores de bromodominios son herramientas muy útiles para poder determinar el rol biológico exacto de los bromodominios pero además tiene un gran valor potencial para el tratamiento de diversas enfermedades. Hasta el momento solo se han ensayado en modelos de enfermedades en mamíferos pero los resultados obtenidos hasta ahora nos permiten pensar que podrían ser utilizados también para el tratamiento de enfermedades infecciosas y parasitarias. Como ya se mencionó, el valor de CI_{50} obtenido para iBET-151 es comparable con el del Benznidazol, la actual droga utilizada para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Su citotoxicidad en células es baja y se observó una disminución en los porcentajes de infección *in vitro*, lo cual nos permite postular que los bromodominios podrían ser blancos quimioterapéuticos interesantes para el tratamiento de esta parasitosis.

III.3.3 EFECTO DE OTROS INHIBIDORES DE BROMODOMINIOS SOBRE *T. CRUZI*

Los resultados anteriores nos llevaron a pensar que los bromodominios de *T. cruzi* pueden interactuar con inhibidores de bromodominios diseñados contra proteínas de otros organismos. En general, los inhibidores comerciales disponibles fueron desarrollados para interferir en la interacción entre bromodominios humanos e Histonas acetiladas.

En el siguiente ensayo se probaron diez inhibidores comerciales, en su mayoría específicos contra la familia BET, en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*. Se hicieron ensayos de sobrevivencia en epimastigotes de la cepa Dm28c durante 72 horas y se cuantificó la cantidad de parásitos en un contador hematológico automatizado adaptado para el recuento de epimastigotes (Figura 49). Observamos una disminución significativa en el crecimiento durante el tratamiento con dos de los compuestos.

Se ensayó la actividad del iBET-151 comercial y observamos que este último no tiene efecto sobre el crecimiento de epimastigotes. Aparentemente el compuesto comprado a la empresa ApexBio sería un enantiomero no activo del iBET-151 cedido por GSK. Luego, a los compuestos que redujeron significativamente el crecimiento (JQ1(+) y SCG-CBP30) se les calculó la concentración inhibitoria media (Figura 50). En todos los casos se utilizó Benznidazol (BZN) como control positivo.

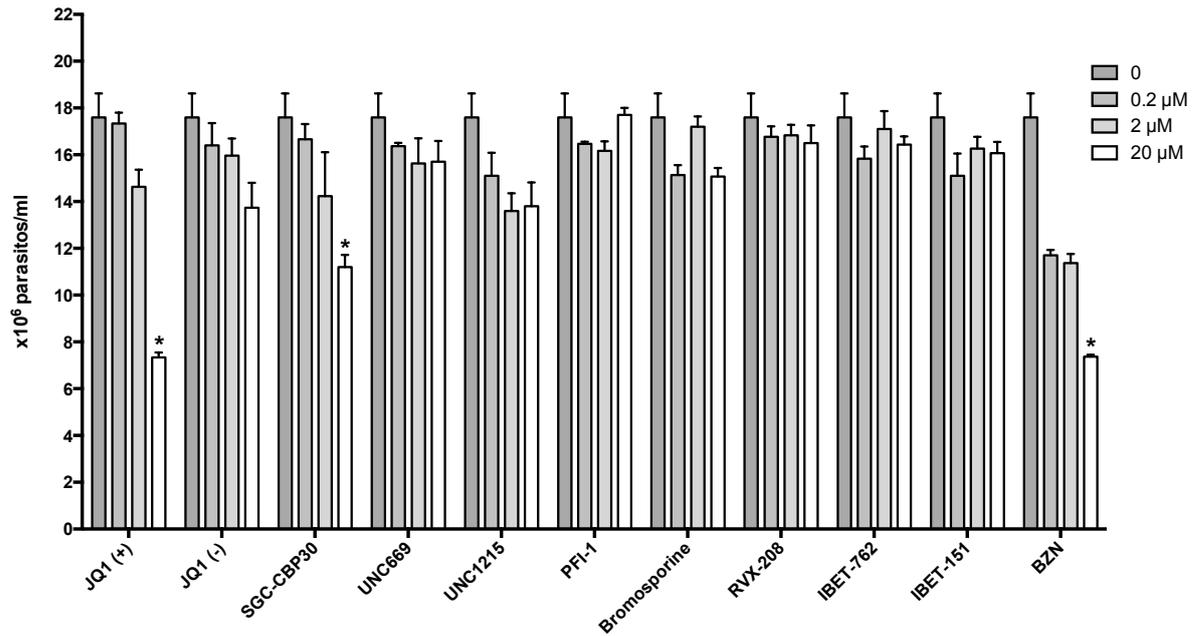


Figura 49: Crecimiento de epimastigotes luego de 72 horas de tratamiento con distintos inhibidores de bromodominios comerciales. Se ensayaron tres concentraciones de cada compuesto. Con un asterisco se indican los compuestos que mostraron una reducción significativa del crecimiento.

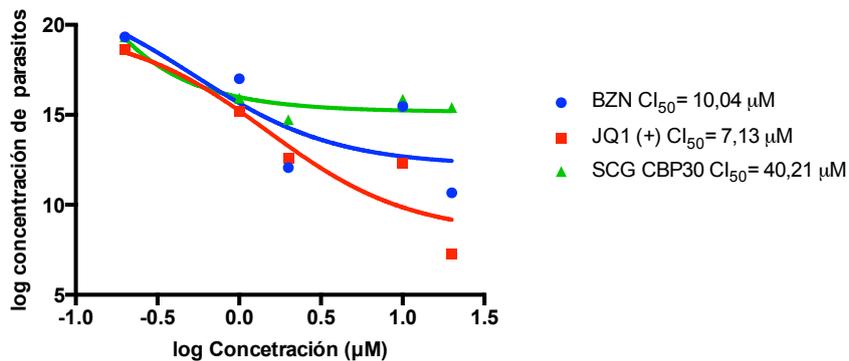


Figura 50: Cálculo de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) para los inhibidores de bromodominios JQ1(+), SGC-CBP30 y Benznidazol (BZN). Las curvas dobles logarítmicas se ajustaron no-paramétricamente.

El inhibidor JQ1(+) es una molécula pequeña permeable que se une específicamente al bromodominio de la proteína humana BRD4, que pertenece a la familia BET. BRD4 se mantiene unido en los sitios de inicio de la transcripción de genes que se expresan durante la transición del ciclo celular M/G1, influencia la progresión mitótica y se lo ha asociado a carcinomas escamosos humanos. Se ha reportado que JQ1(+) presenta un efecto anti-neoplásico en células en cultivo derivadas de este tipo de cáncer (Filippakopoulos et al., 2010). Si bien por cuestiones de tiempo no se realizó en el presente trabajo de Tesis, sería interesante caracterizar la interacción de este inhibidor con *TcBDF3*, como se realizó con iBET-151.

III.3.4 DISCUSIÓN GENERAL

La expansión de las células cancerígenas y la replicación de parásitos en el huésped comparten una característica, su rápida capacidad para dividirse. Además, existen algunas similitudes entre las estrategias de evasión del sistema inmune compartidas por parásitos y tumores y ambos presentan una alta tasa de actividad metabólica fuera del control del huésped. Los parásitos protozoos que causan enfermedades importantes en humanos y otros mamíferos tienen ciclos de vida complejos y los cambios que sufren entre los distintos estadios involucran diversas modificaciones morfológicas y cambios en la expresión génica para poder sobrevivir a los distintos ambientes donde se desarrollan, en algunos casos extremos, como dentro de los fagolisosomas donde son expuestos a metabolitos tóxicos y pH ácido. Se ha reportado el uso terapéutico de inhibidores de desacetilasas, tanto en células cancerígenas como en diferentes especies de parásitos (Ouaissi & Ouaissi, 2006). Como se explicó en este capítulo, se han ensayado diversos inhibidores de bromodominios contra tumores malignos, varios de los cuales se encuentran en fase clínica I/II. Los resultados obtenidos en esta tesis, aunque preliminares, nos permiten postular que los inhibidores de bromodominios podrían ser útiles tanto para el estudio del rol regulatorio de la acetilación en tripanosomátidos como para el tratamiento de enfermedades parasitarias.

Evidentemente, como ocurre en otros protozoos, los procesos mediados por acetilación son importantes en *Trypanosoma cruzi*. Se observó en otros tripanosomátidos que las enzimas encargadas de desacetilar diversos blancos son necesarias para su supervivencia (Ingram & Horn, 2002, Wang et al., 2010a). Además, se ha demostrado que inhibidores de desacetilasas de distintas clases son efectivos contra *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* y *Trypanosoma brucei* (Kelly et al., 2012, Guerrant et al., 2010, Andrews et al., 2009, Vanagas et al., 2012). Como ya se mencionó, la inhibición de HDAC es un blanco ampliamente validado como estrategia terapéutica para el tratamiento de cáncer. Su actividad anti-proliferativa se da tanto a través de la interferencia con el remodelado de la cromatina así como mediante la alteración del estado de acetilación de proteínas no-histonas claves para distintos procesos celulares (Frew et al., 2009). El número de inhibidores de desacetilasas que son aprobados y entran al mercado para tratamiento de tumores se encuentra en aumento continuamente y sería muy importante evaluar su actividad contra distintos parásitos.

El bromodominio representa una super familia extensa en humanos que está presente en una amplia variedad de proteínas. En los últimos años se obtuvieron modelos estructurales de alta resolución de bromodominios a gran escala, lo que permitió una buena caracterización estructural de los mismos. Por el contrario, solo algunos pocos sustratos se

han identificado lo que dificulta la caracterización funcional de los bromodominios, en particular los que tienen sustratos no-histonas. Creemos que el desarrollo de inhibidores específicos contra los BRDs será una de las herramientas más poderosas para investigar las funciones celulares de los bromodominios y su rol en la enfermedad.

Entonces, los resultados obtenidos durante este trabajo nos permiten postular que por los menos uno de los factores con bromodominio es esencial para este parásito y tiene un rol completamente diferente al reportado para otros organismos. Los bromodominios de *Trypanosoma cruzi* son blancos interesantes para el desarrollo de nuevas drogas y por lo tanto, un punto de partida para plantear nuevas líneas de trabajo. Por otro lado, nos parece que la metodología propuesta para evaluar la interacción *in vitro* entre TcBDF3 recombinante y el iBET-151 mediante atenuación de la fluorescencia puede escalarse y permitir la evaluación a gran escala de diversos inhibidores de bromodominio comerciales.

CONCLUSIONES



IV CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante este trabajo pretenden acrecentar el conocimiento sobre los procesos mediados por acetilación en *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Como primera aproximación se caracterizó la localización subcelular del factor con bromodominio 3 de *T. cruzi* utilizando diferentes técnicas. Luego, se identificó a uno de los interactores de TcBDF3, la α -tubulina acetilada. Por otro lado, mediante técnicas de genética reversa, se obtuvieron líneas de epimastigotes sobre-expresantes para diferentes construcciones mutantes de TcBDF3. Con estas líneas se realizaron curvas de crecimiento, ensayos de metaciclologénesis e infecciones *in vitro*.

A partir de estos resultados podemos concluir que TcBDF3 es una proteína con bromodominio no-nuclear en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. En epimastigotes y amastigotes se localiza en el citoplasma, flagelo y en la región del bolsillo flagellar, mientras que en tripomastigotes solo está presente en el flagelo y bolsillo flagellar. En estas estructuras colocaliza con α -tubulina acetilada, la isoforma de tubulina más abundante. Observamos también que la localización de TcBDF3 se va modificando gradualmente a lo largo del proceso de diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes. La interacción de TcBDF3 con α -tubulina acetilada fue verificada mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y far western blot con péptidos de tubulina sintéticos. Pudimos determinar que esta interacción es específica y aparentemente se estaría dando solo en algunas regiones subcelulares. En cuanto a los ensayos funcionales pudimos determinar que el extremo C-terminal de TcBDF3 es necesario para su localización flagelar en tripomastigotes. Al sobre-expresar de manera inducible una versión doble mutante puntual de TcBDF3 observamos una disminución en la tasa de crecimiento de epimastigotes así como una disminución marcada en las tasas de metaciclologénesis. Al realizar ensayos de infección en células Vero observamos diferentes fenotipos al sobre-expresar la versión salvaje y la doble mutante. Estos resultados permiten concluir que TcBDF3 está involucrado en el proceso de diferenciación e infección en *T. cruzi*.

En la última parte de este trabajo evaluamos el potencial efecto de distintos inhibidores de bromodominios comerciales sobre epimastigotes de *T. cruzi* y realizamos ensayos de interacción *in vitro* con TcBDF3 recombinante y uno de estos inhibidores. Como conclusión de esta parte podemos decir que algunos de los inhibidores ensayados, que fueron diseñados para interferir en la unión de bromodominios humanos con sus ligandos naturales, son capaces de alterar el crecimiento de epimastigotes. Mediante ensayos de

Bromodominios citoplasmáticos y acetilación de proteínas no nucleares en Trypanosoma cruzi

atenuación de la fluorescencia pudimos determinar que TcBDF3 recombinante pero no la forma mutante se une de manera específica al inhibidor I-BET151. Estos resultados son aún preliminares pero nos permiten postular a los bromodominios como potenciales blancos quimioterapéuticos contra la Enfermedad de Chagas.

MATERIALES Y MÉTODOS



V MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

V.1.1 BASES DE DATOS

Las secuencias del genoma de *Trypanosoma cruzi* ensamblado se obtuvieron de la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), donde se realizaron las búsquedas por similitud mediante BLAST (BLASTp o BLASTn). Las comparaciones por BLASTp, PSI o PHI-BLAST contra la base de datos no redundante de Genbank se realizaron en el sitio NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

V.1.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Para el análisis y comparación de las secuencias y estructuras primarias de las proteínas se utilizaron diversos sitios de análisis en línea:

Para la predicción de dominios y sitios de acetilación se utilizaron los servidores Pfam (<http://pfam.xfam.org>) y NetAcet 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAcet/>).

Para determinar porcentajes de identidad y similitud entre pares de proteínas y realizar alineamientos múltiples se utilizó el programa ClustalX. Los alineamientos múltiples se editaron con BioEdit o en línea con el programa ESPript 3.0 (<http://esript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

Para la predicción y alineamientos de estructuras secundarias se utilizó el programa Modeller (<https://salilab.org/modeller/>) y el servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>).

Para la predicción de localización subcelular se utilizaron los servidores en línea Wolf pSORT (<http://wolfsort.org>), pSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) y TFPP (<http://wukong.tongji.edu.cn/tfpp/>).

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se editaron con el paquete DNASTAR versión 7.0.0 (Lasergene).

V.2 MEDIOS DE CULTIVOS Y CEPAS

V.2.1 MEDIOS Y CEPAS BACTERIANAS

Para el cultivo y mantenimiento de cepas bacterianas se utilizó el medio Luria Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989), cuya composición es:

Peptona	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O csp	1 l

Cuando este medio se requirió en estado sólido se le agregó agar-agar a una concentración de 1,5%.

Los antibióticos para selección se usaron en las siguientes concentraciones finales:

Ampicilina (Amp)	100 µg/ml
Kanamicina (Kan)	40 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	10 µg/ml
Cloranfenicol (Cf)	20 µg/ml

El genotipo de las distintas cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detalla en la Tabla IV.

<i>E. coli</i>	Genotipo
DH5α	supE44, ΔlacU169, (φ80lacZ ΔAM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1
XL1 Blue	MRF' (^(mcrA) 183 ^(mcrB- hsd SMR- mrr) 173 endA1 supE44 ti-1 recA1 gyrA96 lac [F' proAB lacI ^q Z ^M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r])
BL21	(F ⁻ dcm ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal [lon] (DE3 immP21 int ⁺ lacI ⁺ lacUV5::lacZ::T7 RNA polimerasa)
BL21/pLys S	(F ⁻ dcm ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal [lon] (DE3 immP21 int ⁺ lacI ⁺ lacUV5::lacZ::T7 RNA polimerasa) [pLys S cam ^r])
ccdB Survival™ 2T1^R	F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG fhuA::IS2

Tabla IV: Cepas bacterianas utilizadas.

Las cepas se cultivaron en medio líquido con agitación (250 rpm) en baños termostatzados o en medio sólido en estufas a 37°C.

V.2.2 MEDIOS Y CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Para el cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* se utilizó medio LIT (del inglés “Liver Infusion Tryptose”) que contiene:

Infusión de hígado	5 g
NaCl	4 g
KCl	0,4 g
Triptosa	5 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	8 g
Glucosa	4 g
Hemina (1 mM en NaOH 0.2 N)	20 ml (20 μM) (luego de autoclavar)
Suero Fetal Bovino (SFB)	100 ml (10%) (luego de autoclavar)
H ₂ O csp	1 l

La selección de parásitos transfectantes se realizó mediante el agregado de Geneticina (G418) e Hygromicina en concentraciones 100-200 μg/ml según se detalla más adelante.

Para inducir el proceso de metacicloogénesis en la cepa Dm28c se utilizó el medio TAU (del inglés “Triatomine Artificial Urine”) compuesto por:

CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	2 mM
NaHCO ₃	0,035%
NaCl	190 mM
KCl	17 mM
NaH ₂ PO ₄	15 mM
Na ₂ HPO ₄	0,47 mM
H ₂ O csp	1L

El mismo se llevó a pH 6.5 con NaH_2PO_4 2M y se esterilizó por filtrado. También se utilizó el medio TAU3AA que está compuesto por TAU con el agregado de Glucosa (10 mM), ácido L-aspártico (2 mM), ácido L-glutámico (50 mM) y L-prolina (10 mM), el cual se esterilizó por filtrado.

Las cepas de *T. cruzi* utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla V.

Cepa o clon	Características relevantes
CL-Brener	Clon de referencia del Proyecto Genoma de <i>T. cruzi</i> , aislada en Rio Grande do Sul (Brasil) de <i>Triatoma infestans</i> . Perteneciente a la DTU IIe (Zingales et al., 2009).
Dm28c	Cepa aislada de la comadreja <i>Didelphis marsupialis</i> . Perteneciente a la DTU I (Contreras et al., n.d.). Su genoma fue secuenciado en 2014 (Grisard et al., 2014).

Tabla V: Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Los epimastigotes de las cepas CL-Brener y Dm28c son mantenidos en nuestro laboratorio a 28°C en medio de cultivo LIT con pasajes a medio fresco cada 3-5 días. Además en el laboratorio se cuenta con “semillas” de las distintas cepas guardadas por congelamiento en nitrógeno líquido.

V.3 TÉCNICAS DE CULTIVO DE *T. CRUZI*

V.3.1 INFECCIONES *IN VITRO*

Se cultivaron células Vero hasta sub-confluencia (30-40% de confluencia) en frascos de cultivo de 25 o 75 cm^3 , utilizando medio de cultivo DMEM con el agregado de SFB 10%. Luego fueron infectadas con tripomastigotes de la cepa Dm28c (8×10^5 parásitos en los frascos de 25 cm^3 y 25×10^5 parásitos en los frascos de 75 cm^3). Se incubaron durante 5 horas a 37°C, se lavaron con PBS y se les agregó medio de cultivo nuevo (DMEM con SFB 10%). Se incubaron a 37°C hasta el día siguiente, que se lavaron con PBS y se les cambió el medio por DMEM con 2% SFB. A las 48 horas post-infección ya se observa la presencia de amastigotes en el citoplasma de las células. Se continua el proceso de infección hasta el día 5 o 6 donde comienzan a aparecer los tripomastigotes que fueron colectadas.

V.3.2 OBTENCIÓN DE AMASTIGOTES

Se utilizaron frascos que se encontraban en el segundo día post-infección (se observaban los citoplasmas de las células Vero con formas no móviles del parásito). Se colocaron las

botellas sobre hielo y se lavaron con PBS frío. Se desprendió la mono-capa por ruptura mecánica utilizando un raspador de células. Luego se colectaron las células y se centrifugó a 1.000 x g por 10 minutos. Se lavó el pellet con PBS frío, siempre manteniendo en hielo, y luego se pasó el lisado diez veces a través de una jeringa de tuberculina. En cada paso se fue observando al microscopio para verificar la presencia de amastigotes. Finalmente se centrifugó a 1.000 x g por 10 minutos y el sedimento obtenido se utilizó para preparar láminas para inmunofluorescencia o se conservaron a -70°C hasta su utilización para la preparación de extractos.

Alternativamente, se realizaron infecciones sobre cubreobjetos circulares estériles en placas de 24 pocillos. Por cada pocillo se agregaron 3.000 células Vero. Luego de 48 horas, se obtuvieron células sub-confluentes, y se realizó la infección con 3×10^4 tripomastigotes por pocillo. Luego de 48 horas post-infección los pocillos fueron lavados con PBS y fijados con para-formaldehído 4% por 20 minutos o metanol durante 5 minutos. Luego del paso de fijación, los pocillos fueron lavados con PBS dos veces y los cubreobjetos conteniendo las células fijadas sobre ellos se conservaron en PBS hasta su posterior utilización para inmunofluorescencia o tinción con el colorante Giemsa.

V.3.3 OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES

Se utilizaron frascos que se encontraban entre el quinto y séptimo día post-infección, donde se observaba la presencia de tripomastigotes fuera de las células en el sobrenadante del cultivo. Para colectar éstas formas móviles, se juntaron los sobrenadantes de cada frasco y se centrifugaron a 1.500 x g. Los sedimentos fueron lavados con PBS y luego se resuspendieron en 1 o 2 ml de PBS. Se contaron en cámara de Neubauer y luego se prepararon láminas para inmunofluorescencia o se centrifugaron para conservar a -70°C hasta su utilización para la preparación de extractos.

V.3.4 OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES METACÍCLICOS (METACICLOGÉNESIS *IN VITRO*)

Se partió de un cultivo de epimastigotes de la cepa Dm28c en fase estacionaria (2×10^7 parásitos/ml), el cuál se colectó por centrifugación a 500 x g por 5 minutos y se lavó con un volumen de PBS. El sedimento se resuspendió en medio TAU en un volumen tal de obtener 5×10^8 parásitos/ml. Se incubó por 2 horas a 28°C y luego se diluyó cien veces en medio TAU3AAG (5×10^6 parásitos/ml). Se tomaron alícuotas a las 72 y 96 horas para visualizar tripomastigotes metacíclicos y formas intermedias mediante tinción con el colorante Giemsa e inmunofluorescencia.

V.3.5 TINCIÓN CON COLORANTE GIEMSA

Los parásitos, previamente colectados y lavados con PBS, se resuspendieron en 1 ml de PBS y se adhirieron en portaobjetos por 20 minutos. Luego se fijaron con para-formaldehído 3,7% en PBS por 5 minutos y se lavaron con agua estabilizada (diluida 1/50) cuatro veces. Finalmente se incubaron con el colorante Giemsa diluido 1/20 en agua estabilizada por 1 hora, se lavaron con agua estabilizada diluida cuatro veces y se dejaron secar al aire. Los preparados se observaron al microscopio óptico.

V.3.6 CONTAJE DE CÉLULAS

Para contar los parásitos, se diluyeron directamente en solución de PBS-formaldehído 4% y colocaron en cámara de Neubauer. Alternativamente, el crecimiento relativo se determinó utilizando un contador hematológico automatizado (W19 Counter AA de Weiner Lab) adaptado para conteo de epimastigotes. Los cultivos se consideraron en fase exponencial temprana de crecimiento cuando contenían densidades de entre $0,5-1 \times 10^7$ parásitos/ml, en fase exponencial entre $1-5 \times 10^7$ parásitos/ml y en fase exponencial tardía entre $5-8 \times 10^7$ parásitos/ml. Las curvas de crecimiento fueron realizadas por triplicado contando todos los días o cada dos días. Alternativamente, se fueron diluyendo las curvas al medio cada dos días y corrigiendo la concentración de parásitos obtenida por el factor de dilución.

V.4 TÉCNICAS PARA EL TRABAJO CON PROTEÍNAS

V.4.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN *E. COLI*

CONDICIONES GENERALES DE INDUCCIÓN Y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

E. coli BL21 o BL21-pLys conteniendo el plásmido de interés se cultivaron a 37°C durante 16 horas con agitación constante, en LB suplementado con 0,1 mg/ml de ampicilina. Este cultivo saturado se utilizó en relación 1:100 para inocular 10 a 1000 ml de LB suplementado con ampicilina 0,1 mg/ml. Las células se crecieron con agitación constante a 37°C o 30°C entre 3 y 4 horas (hasta $DO_{600nm} \sim 0,6$). Luego se realizó la inducción por agregado de IPTG 0,1-0,5 mM a 37°C, 30°C o 22°C, durante 4 o 16 horas. A continuación, las bacterias se recuperaron por centrifugación a 5.000 x g por 5 minutos y se resuspendieron en buffer de lisis correspondiente según el protocolo de purificación. A continuación los extractos se sonicaron en hielo, con 5-15 pulsos de 10 segundos de duración a 25% de amplitud (Procesador Ultrasónico Thomas modelo GEX 600). El lisado obtenido se centrifugó a 16.000 x g a 4°C durante 20 minutos.

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN A POLI-HISTIDINA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Una vez solubilizadas las proteínas en Solución A (Tris-HCl 10 mM pH 8, Urea 8 M, EDTA 10 mM, Tritón X-100 1%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 10 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml, leupeptina 3 mg/ml) se enfrentaron 3 veces con columnas de matriz Ni²⁺-agarosa equilibrada con Solución B (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 M, ajustado a pH 8 con NaOH), con la cantidad de matriz recomendada por el proveedor (Ni²⁺-NTA, Qiagen). Luego se realizaron 2 lavados con 4 ml de Solución C (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 M, ajustado a pH 6,3 con HCl). Posteriormente las proteínas se recuperaron de la columna con solución D (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 M, ajustado a pH 5,9 con HCl) y solución E (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 M, ajustado a pH 4.5 con HCl), colectando fracciones de 700 µl. Luego de la purificación, las fracciones se concentraron utilizando filtros para centrifugación Centriprep YM-10 o Ultrafree-MC (Millipore, Amicom Inc.).

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INSOLUBLES POR LAVADO DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

En el caso de las proteínas de fusión a poli-histidina de expresión insoluble, alternativamente a la purificación en columnas de afinidad de Ni²⁺-agarosa se procedió a la purificación por lavado de cuerpos de inclusión. El sedimento celular obtenido luego de la inducción con IPTG se resuspendió en un volumen de Tris-HCl 10 mM pH 8 y se rompió mediante un homogeneizador de alta presión (primero con una presión de 500 bar y luego dos veces más a 1000 bar). Los cuerpos de inclusión obtenidos por centrifugación se lavaron 2 veces a 4°C durante 10 minutos con agua destilada, luego 2 veces a 4°C durante 10 minutos con agua destilada suplementada con Tritón 0,1% y finalmente 5 veces con agua destilada. Por último se resuspendieron en tampón Glicina NaOH pH 11 incubando toda la noche a 4°C con agitación. Luego se dializaron contra tampón fosfato pH 8 con tres cambios del mismo. La proteína soluble en tampón fosfato obtenida fue cuantificada y su estado de plegamiento fue determinado mediante Dicroísmo Circular.

Tampón Glicina-NaOH pH 11: Se prepara la solución de glicina stock 0,5 M y se titula con NaOH hasta pH 11. Antes de usar se diluye a 100 mM y se le agrega el PMSF.

V.4.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD

Para cuantificar proteínas se utilizó Ácido bicinconfónico y sulfato de cobre pentahidratado en una relación 50/1. Se preparó una curva de calibración con BSA, a 50 µl de muestra (incógnita y curva) se le agregó 150 µl de mezcla de reactivos y se incubó por 20 minutos a 37°C. Luego se midió absorbancia a 630 nm y se determinó el contenido proteico de la

muestra incógnita a partir de la curva de calibración de BSA. Alternativamente se utilizó el kit comercial "BioRad Protein Assay" según las indicaciones del fabricante.

V.4.3 COLUMNA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR POR FPLC

Se analizó una preparación de proteína recombinante TcBDF3-His dializada contra tampón fosfato. Se utilizó la columna Superdex 75 (GE Healthcare) en un equipo de FPLC (Amersham Pharmacia Biotech). Se siguieron las instrucciones del fabricante, utilizando PBS como tampón. Como marcadores se utilizaron: azul de dextrano, BSA, GST y lisozima. Todas las soluciones fueron filtradas antes de su utilización.

V.4.4 OBTENCIÓN DE ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR, UV-VISIBLE Y DE FLUORESCENCIA

Los espectros de dicroísmo circular (Jasco) se obtuvieron en el UV-lejano (195-250 nm). Se acumularon 11 espectros con un ancho de banda de 1 nm en una cubeta de cuarzo de 0,1 cm. Los datos obtenidos se convirtieron a elipticidad molar.

Los espectros UV-visible de las proteínas recombinantes se realizaron en un espectrofotómetro Gene Quant 1300 (GE) utilizando un cubeta de 1 cm de paso óptico. Se colectaron espectros barriendo desde 250 a 400 nm de longitud de onda.

Los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro (Cary Eclipse) excitando a 295 nm y barriendo la muestra desde 300 a 450 nm de longitud de onda. Se utilizó una cubeta para fluorescencia de 3 ml.

V.4.5 INMUNIZACIÓN DE RATONES Y CONEJOS PARA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS

Las proteínas de fusión purificadas se electroeluyeron y se inyectaron en ratones BALB/c (de 60-90 días de vida) en forma subcutánea con 25 a 50 μg de proteína (1:1) en adyuvante de Freund's completo (Sigma), con dos refuerzos de 12,5 a 25 μg de proteína en adyuvante incompleto con intervalos de 14 días. Los ratones se sangraron por punción cardíaca y los sueros se obtuvieron por centrifugación después de dejar coagular la sangre por 2 horas a 37°C. Las inmunizaciones de conejos se hicieron también inyectando en forma subcutánea 100 μg de proteína en la primera dosis y dos refuerzos de 50 μg , siguiendo el mismo esquema que para los ratones. Posteriormente, se sangraron y se separó el suero.

V.4.6 PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TcBDF3

INMOVILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE (TcBDF3-HIS) EN LA MATRIZ DE NI-AGAROSA

Se utilizaron 0,5 ml de resina de Ni²⁺-agarosa, la cual se lavó con 20 volúmenes de PBS. Luego, se incubó con 300 µg de proteína recombinante en 1 ml de PBS a 4°C, con agitación, durante al menos dos horas. Se lavó con 20 volúmenes de PBS para eliminar la proteína no adherida y se incubó con 1 ml de formaldehído 1% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente para fijar covalentemente la proteína recombinante a la resina.

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos se purificaron a partir de suero de conejo o ratón obtenido por inmunización de dichos animales con *TcBDF3* recombinante. Para la purificación se procedió a incubar la columna (con la proteína recombinante inmovilizada) con al menos un volumen de suero, en agitación, durante tres horas o toda la noche a 4°C. Luego se lavó con 30 volúmenes de PBS. Los anticuerpos anti-*TcBDF3* se eluyeron en cinco alícuotas de 500 µl de trietilamina 0,1 M pH 11,5, las cuales se neutralizaron inmediatamente con HCl 0,3 M. Los anticuerpos se concentraron en columnas de centricon (Millipore) o directamente se conservaron a -20°C con el agregado de 50% de glicerol.

V.4.7 EXTRACTOS PROTEICOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

EXTRACTOS PROTEICOS TOTALES

Se utilizaron 400 ml de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial (2×10^7 parásitos/ml). Alternativamente, se utilizaron amastigotes o tripomastigotes purificados. El cultivo se colectó por centrifugación a 3.000 x g por 10 minutos y se lavó con PBS dos veces. El sedimento se resuspendió en 400 µl de tampón de lisis (Hepes 50 mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 0,25%, Nonidet P-40 1%, PMSF 1 mM y Aprotinina 10 µg/ml) y se le realizaron 3 ciclos de congelado/descongelado a -70°C. A continuación se sonicó dando 5 pulsos de 15 segundos con una amplitud de 25% y se centrifugó a 15.000 x g por 15 minutos, el sedimento obtenido se resuspendió en 500 µl de Tris-HCl 100 mM pH 8 y tampón de siembra. La muestra se hirvió por 5 minutos y se centrifugó 15 minutos a 15.000 x g.

EXTRACTOS ENRIQUECIDOS EN PROTEÍNAS DE CITOESQUELETO Y FLAGELO

Se utilizaron 200 ml de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial (2×10^7 parásitos/ml). El cultivo se colectó por centrifugación a 500 x g por 5 minutos y se lavó 3 veces con PBS. Luego se incubó por 30 minutos con 2 ml de tampón MME (10 mM Mops pH 6,9, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄) con el agregado de Tritón X-100 0,1%, PMSF 0,5 mM y Aprotinina 10 µg/ml en hielo. Se centrifugó a 15.000 x g por 15 minutos a 4°C, el

sobrenadante obtenido (Sn1) se reservó. El sedimento se resuspendió en 2 ml de tampón MME con el agregado de Tritón X-100 0,1%, PMSF 0,5 mM, aprotinina 10 µg/ml, NaCl 1 M y se incubó 15 minutos en hielo. Se sonicó dando 2 pulsos de 15 segundos con una amplitud de 25% y luego se volvió a centrifugar a 15.000 x g por 20 minutos a 4°C obteniéndose el sobrenadante (Sn2) que corresponde a proteínas solubles del citoesqueleto. El sedimento (P) corresponde mayoritariamente a proteínas del flagelo y proteínas insolubles del citoesqueleto. Los sobrenadantes se concentraron precipitando con Ácido tricloroacético (TCA) al 20% toda la noche a 4°C. Luego se centrifugaron a 15.000 x g por 15 minutos y se lavaron con acetona 2 veces. Los precipitados se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se resuspendieron en 100 µl de Tris-HCl 100 mM pH 8 y tampón de siembra.

OBTENCIÓN DE COMPLEJOS FLAGELARES Y CITOESQUELETOS AISLADOS PARA INMUNOFLUORESCENCIA

Se utilizó 1 ml de cultivo de epimastigotes en fase exponencial y se centrifugó a 500 x g por 5 minutos. Las células se resuspendieron en 400 µl de PBS y se adherieron en portaobjetos tratados con Poli-lisina 0,1 µg/µl (Sigma) durante 20 minutos a 37°C. A continuación los parásitos adheridos se incubaron en tampón MME suplementado con Tritón X-100 0,1% por 10 minutos en hielo tres veces, obteniéndose los citoesqueletos aislados adheridos al vidrio. Alternativamente, los citoesqueletos se incubaron en tampón MME suplementado con Tritón X-100 0,1% y NaCl 1 M por aproximadamente un minuto verificando en el microscopio óptico que los microtúbulos se hubieran disuelto. De esta manera se obtuvieron los complejos flagelares adheridos al vidrio.

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR CON DIGITONINA

Se cosecharon epimastigotes en fase exponencial de crecimiento (1×10^7 parásitos/ml), se lavaron con tampón STE (Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7,4, EDTA 1 mM) frío dos veces y se resuspendieron a una concentración final de 10 mg/ml de proteína celular. La digitonina se disolvió en STE a baño maría (2 mg/ml) y se diluyó en cantidades decrecientes. Se prepararon los tubos de reacción incubando los extractos celulares con distintas concentraciones de digitonina, por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C) e inmediatamente se colocó en hielo y se centrifugó 3 minutos a 15.000 x g a 4°C para separar la fracción soluble que se utilizó para medir las actividades enzimáticas. Luego los extractos se conservaron a -70°C hasta su utilización. En paralelo se procesó un tubo con tampón de lisis en presencia de Tritón X-100 0,1% como control de lisis total.

Para medir la actividad malato deshidrogenasa en los extractos obtenidos, se incubaron 5 μ l de NADH 0,5 mM, 10 μ l de Oxalacetato 1 mM, 2 μ l de Tritón X-100 20% y 20 μ l de extracto en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8. El porcentaje de actividad se determinó espectrofotométricamente a través de la medida de la oxidación del NADH ($\epsilon_{339\text{nm}}=6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 340 nm. Para medir la actividad α -hidroxi-ácido deshidrogenasa en los extractos obtenidos, se incubaron 4 μ l de NADH 0,5 mM, 7 μ l de Fenilpiruvato 1 mM, 2 μ l de Tritón X-100 20% y 40 μ l de extracto en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8. El porcentaje de actividad se determinó espectrofotométricamente a través de la medida de la oxidación del NADH ($\epsilon_{339\text{nm}}=6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 340 nm.

V.4.8 SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Se utilizaron geles de 12% y 15% de acrilamida:bisacrilamida 29:1. Las muestras se sembraron en geles desnaturalizantes mezclándolas 4:1 con tampón de siembra (Tris-HCl pH 6.8 100 mM, SDS 2%, DTT 200 mM, glicerol 20% y azul de bromofenol 0,1%) y se corrieron en tampón de corrida Tris-Glicina-SDS (preparado a partir del Stock 5X: 15,1 g/l Tris base; 72 g/l glicina; 5 g/l SDS). Los geles fueron teñidos con Coomassie Blue G-250 (Sigma) o con plata. Los tamaños de las proteínas fueron estimados por comparación con el marcador de peso molecular Prestained Broad Range (Thermo Scientific). Alternativamente, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa para su inmunodetección por western blot.

V.4.9 TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA CON PLATA

La tinción con plata es más sensible y además permite la recuperación de las bandas de proteínas para su posterior análisis por espectrometría de masa (límite de detección 2 a 5 ng de proteína por banda). Una vez finalizada la corrida electroforética, incubar el gel en solución de fijación (12% de ácido acético, 50% etanol y 0,5 ml de formaldehído por litro de solución) durante por lo menos 1 hora en agitación lenta. Luego, lavar tres veces (5, 10 y 15 min) con etanol al 50%, enjuagar aproximadamente 30 segundos con una solución de tiosulfato de sodio 0,2 g/l y luego tres veces (lavados de 5-10 segundos) con agua. Se incuba 20 min a 1 hora con la solución de nitrato de plata (2 g/l AgNO_3 , 0,75 ml de formaldehído por litro de solución), se enjuaga tres veces con agua y se agrega la solución de revelado (30 g/l Na_2CO_3 ; 20 ml/l solución de tiosulfato; 0,5 ml/l de formaldehído). Por último, se agrega solución de fijación para detener la reacción. Los geles teñidos con plata se pueden conservar en una solución de 25% etanol y 3% glicerol.

V.4.10 ELECTRO-ELUCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE GELES DE ACRILAMIDA

Para recuperar las proteínas a partir de geles de acrilamida se utilizó el sistema “Electro-Eluter Model 422” de BioRad de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, luego de teñir con Azul Coomassie G-250, se cortaron las regiones del gel conteniendo la proteína de interés en pequeños pedazos, y se colocaron en el equipo. Las proteínas se recuperaron en la misma solución de electroforesis aplicando una corriente constante de 8-10 mA por cada tubo de proteína durante 3 a 5 horas.

V.4.11 WESTERN BLOT

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando la técnica de electrotransferencia húmeda o semi-seca en solución de transferencia (Tris base 48 mM; glicina pH 8 39 mM; SDS 0,03% y metanol 20%) en el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell o Trans-Blot SD semi-dry Transfer Cell de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las membranas se bloquearon 1 hora a temperatura ambiente con leche descremada 5% en PBS y luego se incubaron con los anticuerpos primarios en la dilución adecuada durante 3 horas a temperatura ambiente, o alternativamente 16 horas a 4°C. Los lavados se realizaron en PBS con Tween 0,2% o 0,5%, típicamente tres lavados de 5 minutos cada uno. Luego se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en una dilución 1/20.000 durante una hora seguido de tres lavados con PBS Tween 0,5% y un último lavado en PBS, todos de 10 minutos. Finalmente, se reveló por quimioluminiscencia detectada por autorradiografía (ECL Plus, Amersham). Alternativamente, se reveló colorimétricamente incubando con una mezcla de 4 Cl-Naftol (360 mg/100 ml en etanol 96%) y H₂O₂ (30 volúmenes).

V.4.12 FAR WESTERN BLOT Y SLOT BLOT

Se inmovilizaron 10 µg de péptidos sintéticos de tubulina (PDGAMPSDKTIGVEDDA; Genscript), tubulina acetilada (ac) en la lisina 40 (PDGAMPSDKacTIGVEDDA; Genscript) y histona H4 acetilada en la lisina 14 (AKGKKSGEAKGTQKacRQ (da Cunha et al., 2006)) en membranas de nitrocelulosa mediante el equipo Bio-Dot SF de BioRad según las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron bloqueadas y luego incubadas con TcBDF3 o TcBDF2 recombinante fusionadas a histidina por 3 horas (0,5 µg/ml), y las proteínas unidas se visualizaron utilizando anticuerpos anti-histidina (GE Healthcare).

V.4.13 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Para los ensayos de inmunoprecipitación se prepararon extractos de proteínas enriquecidas en citoesqueleto y flagelo como se explicó anteriormente pero previamente se estabilizaron

los complejos celulares (se utilizaron 10^{10} parásitos por inmunoprecipitación). Para esto los epimastigotes fueron incubados con dithiolbis (succinimidylpropionato) (DSP) (Thermo) 1 mM por 2 horas en hielo. La reacción se detuvo con Tris 20 mM pH 7,5.

Las inmunoprecipitaciones se realizaron con esferas magnéticas (Dyna Beads, Invitrogen) acopladas a anticuerpos anti-*Tc*BDF3 y anti-Proteína A siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos se incubaron con las esferas acopladas durante 3 horas a 4°C en agitación suave. Luego, se lavó con buffer MME una vez y dos veces con Last Wash buffer (Tris 30 mM pH 7,5; Tween 20 0,02%). Los inmunocomplejos adheridos a las esferas magnéticas acopladas a anti-*Tc*BDF3 se separaron con NH_4OH 0,5 M y luego se neutralizaron con HCl para ser analizados por SDS-PAGE y western blot.

V.4.14 INMUNOCITOLOCALIZACIÓN

Parásitos previamente colectados y lavados con PBS se resuspendieron en 1 ml de PBS y se adhirieron por 20 minutos en portaobjetos previamente tratados con Poli Lisina 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 30 minutos a 37°C. Luego se fijaron con formaldehído 3,7% en PBS por 20 minutos, se incubaron con metanol frío por 5 minutos y con Tritón X-100 0,2% en PBS por 10 minutos para permeabilizar. Finalmente se lavaron con PBS 3 veces. A continuación se incubaron con el anticuerpo primario específico diluido en PBS-BSA 1% por 2 horas (para los experimentos de co-localización se incubaron simultáneamente los dos anticuerpos primarios). Se lavaron con PBS-Tween 0,01% 2 veces y luego se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, de ratón o de rata conjugados a fluoresceína o rodamina (para los experimentos de co-localización se incubaron ambos anticuerpos al mismo tiempo) junto con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI). Finalmente se lavaron con PBS Tween 0,01% en PBS 2 veces. Los preparados obtenidos se montaron utilizando líquido de montar Vecta Shield (Vecta). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse NiU E300 y confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2. Para el análisis y edición se utilizaron los programas Adobe Photoshop CS versión 8.0.1. (Adobe Systems Incorporated), Nikon EZ-C1 FreeViewer version 3.70 (Nikon Corporation) o ImageJ (Collins, 2007).

V.4.15 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Los parásitos fueron fijados en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,2 con glutaraldehído 0,3%, formaldehído 4%, y ácido pícrico 1%. Posteriormente se deshidrataron utilizando soluciones de acetona de concentración creciente y fueron infiltrados progresivamente utilizando Unicryl a baja temperatura. La polimerización de la resina fue realizada en cápsulas BEEM a 20°C

durante 5 días bajo luz UV. Las secciones ultra finas se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo Leica (Reichert Ultracuts) y se incubaron en NH_4Cl 50 mM durante 30 minutos. Luego se incubaron en solución de bloqueo (BSA 3%, gelatina teleostean 0,5% y Tween-20 0,02% diluidos en PBS) por 30 minutos y posteriormente en solución de bloqueo conteniendo suero de carnero (1:250). Seguido a esto, las secciones se incubaron durante 1 hora con anticuerpos anti-TcBDF3 preparado en solución de bloqueo y se lavaron con PBS. Paso siguiente se realizó la incubación durante 45 minutos con el anticuerpo secundario marcado con partículas de oro, se lavó con solución de bloqueo y se tiñó con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio de transmisión Zeiss 900. En los ensayos control no se utilizó el anticuerpo primario.

V.5 TÉCNICAS PARA EL TRABAJO CON ÁCIDOS NUCLEICOS

V.5.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 μl conteniendo solución de amplificación comercial suplementada con 2,5 mM MgCl_2 ; 0.1 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP); 20 pmoles de cebador directo y reverso, y 1U de polimerasa Taq (Invitrogen o Pegasus). Se empleó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient y la amplificación de los fragmentos se realizó en 35 ciclos de desnaturalización (40 segundos a 94°C), hibridación (40 segundos a la temperatura óptima para cada par de cebadores), extensión (72°C con el tiempo fijado a 1 minuto por 1Kpb a amplificar), seguido por un paso final de extensión durante 5 minutos.

Para las PCRs de colonia bacteriana se tomó una colonia directamente de la placa con un palillo estéril y luego de generar una réplica en una nueva placa se resuspendió el material restante en el palillo en la mezcla de reacción de PCR.

Los cebadores utilizados durante este trabajo se detallan en la tabla VI.

Nombre	Secuencia	Observaciones
BDF3Fw	AAGGATCCATGGGCTCTACGGGTCGG	Sitio <i>Bam</i> HI
BDF3Rv	AACTCGAGCCTCGTCTCCACCGCC	Sitio <i>Xho</i> I
BDF3dCFw	AAGGATCCGAGCGTCTTGCGGAAGAGC	Sitio <i>Bam</i> HI
BDF3dCRv	AACTCGAGTGCTCTTCCGCAAGACGCTCC	Sitio <i>Xho</i> I
BDF3HA Fw	AAGGATCCATGTATCCGTATGATGTGCCCGGAT TATGCTGGCTCTACGGGT	Sitio <i>Bam</i> HI Epítotope de hemaglutinina (HA)
BDF3LxA Fw	C GACTCCGCTGCGGTTAAAG	
BDF3LxA Rv	C TTTAACCGCAGCGGAGTGC	Utilizados para obtener los mutantes puntuales de <i>Tc</i> BDF3
BDF3YxA Fw	C T GCGAGAAGGCTAACGGCG	
BDF3YxA Rv	C G CCGTTAGCCTTCTCGCAG	
M13 Fw	C G C C A G G G T T T T C C C A G T C A C G A C	Utilizados para verificar los clonados en vector pCR2.1 TOPO
M13 Rv	T C A C A C A G G A A A C A G C T A T G A C	
AttL1	C A A C T T T G T A C A A A A A A G C A G G C	Utilizado para verificar los clonados en el vector de entrada del Sistema Gateway pENTR3C
AttL2	G T A C A A G A A A G C T G G G T C T A G	
HX1-Fw	C T T T T C C A A C T T C T T T T A T G A T G	Utilizados para verificar los clonados en el p <i>Tc</i> INDEX
igAct-Rv	C A A G G A C A G A A A A C G G T A A G	

Tabla VI: Cebadores utilizados en este trabajo.

V.5.2 MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA TIPO ZOE-PCR

Para la obtención de las mutantes puntuales se utilizó una estrategia de mutagénesis sitio dirigida de tipo ZOE-PCR (Figura 51). Se diseñaron los oligonucleótidos cebadores BDF3YxA Fw, BDF3YxA Rv, BDF3LxA Fw y BDF3LxA Rv (tabla VI), donde los codones que codifican para Y103 y L110 de *Tc*BDF3 fueron reemplazados por codones que codifican para alanina (A).

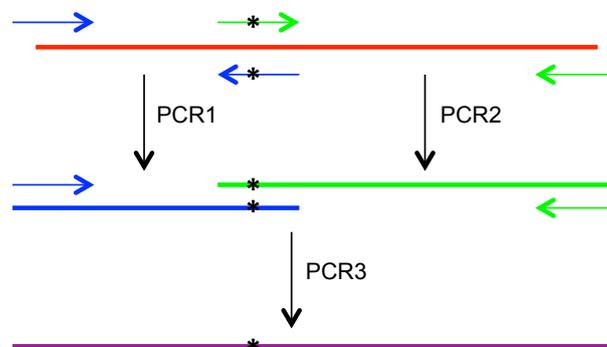


Figura 51: Esquema de la estrategia de ZOE-PCR para generar mutantes puntuales. Con asteriscos se indica el codón mutado.

Para las reacciones de PCR se utilizó como molde el plásmido pCR2.1TOPO-*TcBDF3*. Se realizaron 30 ciclos de reacción, una temperatura de hibridación de 55 °C, mayor concentración de dNTPs (cuatro veces el valor habitual) y la enzima Pfx (el doble de lo utilizado generalmente). Una vez obtenidos los plásmidos pCR2.1TOPO-*TcBDF3Y103A*, pCR2.1TOPO-*TcBDF3L110A* y pCR2.1TOPO *TcBDF3Y103A/L110A*, se utilizaron para la obtención de los fragmentos de interés, y su posterior clonado en el vector de entrada del sistema Gateway pENTR3C (Invitrogen) y luego en pDEST17 (Invitrogen) o p*TcINDEX*-GW (construido como parte de este trabajo). Las secuencias codificantes para *TcBDF3*, *TcBDF3-HA*, *TcBDF3 Y103A/L110A-HA* fueron clonadas en los vector pDEST17, para la obtención de *TcBDF3* y sus variantes expresadas como fusión al epítipo de seis histidinas.

V.5.3 DIGESTIÓN DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las condiciones de corte utilizadas fueron las recomendadas por los proveedores de las endonucleasas de restricción (Promega, Invitrogen, Fermentas). En términos generales se utilizó aproximadamente 1 U de enzima por µg de ADN. Los productos obtenidos luego de la reacción se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se estimó el tamaño de los fragmentos generados por comparación con marcadores de peso molecular comerciales.

V.5.4 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Las muestras de ADN (ADN plasmídico, fragmentos de restricción, productos de PCR) fueron resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración (0.8% a 2%) según el tamaño de los fragmentos a separar. Se utilizó el sistema de tipo submarino (Sambrook et al., 1989). La solución reguladora TAE 0,5 X se utilizó como solución de electroforesis y para la preparación de geles. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,025 % (p/v) azul de bromofenol; 0,025% (p/v) xilencianol y 30% (v/v) glicerol, en una proporción 5:1 en volumen de muestra: solución de siembra. Como marcadores de peso molecular se utilizaron λ-*HindIII*, 100 pb ladder o 1 kpb ladder (PBL). La corrida electroforética se realizó a una intensidad de corriente constante de 50 mA a 70 mA. Para el revelado se utilizó el agente intercalante Gel Green (Genbiotech). Luego de la electroforesis el ADN se visualizó por fluorescencia en un transiluminador de luz azul Safe Imager (Invitrogen), las imágenes se digitalizaron con una cámara Sony Cyber Shot DSC-H7 y se procesaron con Adobe Photoshop CS o ImageJ.

V.5.5 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

La purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el equipo comercial “GFX Gel Band Purification Kit” (Amersham/GE Healthcare) según las especificaciones del fabricante. El resultado de la purificación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa.

V.5.6 PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE *ESCHERICHIA COLI*

El ADN plasmídico se preparó a partir de cultivos celulares saturados de *E. coli* conteniendo los plásmidos de interés, utilizando los equipos comerciales “WIZARD PLUS SV Minipreps DNA purification system” (Promega) o “QIAGEN plasmid purification Midi kit” (QIAGEN) según las indicaciones de los fabricantes.

Se determinó la concentración de ADN midiendo la absorbancia (Abs) de una alícuota a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de Abs_{260nm} corresponde a 50 µg de ADN / ml de solución. La calidad de la preparación se evaluó a través del cociente (Abs_{260nm}/Abs_{280nm})(Sambrook et al., 1989).

V.5.7 SECUENCIACIÓN DE ADN

Los plásmidos purificados se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (EEUU).

V.5.8 PURIFICACIÓN DE ADN TOTAL DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Para la purificación de ADN genómico total de *T. cruzi* se utilizó el reactivo DNAzol (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADN se resuspendió en agua destilada estéril y congeló a -20°C hasta su utilización.

V.5.9 CLONADO EN VECTORES TIPO T

Los fragmentos de ADN codificantes de *TcBDF3* se amplificaron por PCR utilizando los cebadores específicos mencionados anteriormente. La secuencia del molde fue verificada previamente por secuenciación. Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa, se purificaron a partir de los mismos y se ligaron en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las mezclas de ligación se transformaron en *E. coli* (DH5α o XL-1 Blue) electrocompetentes y se sembraron con espátula de Drigalsky en placas de LB agar suplementadas con ampicilina, X-Gal e IPTG.

V.5.10 CLONADO POR DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN

A partir de los vectores tipo T conteniendo los fragmentos de interés, se obtuvieron los fragmentos de ADN codificantes digiriendo con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I. El vector de entrada (pENTR3C) del sistema Gateway fue digerido con las mismas endonucleasas de restricción y tratado con fosfatasa alcalina intestinal (Promega), utilizando 1U de esta enzima. Ambas digestiones fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa, a partir del cual se purificaron los fragmentos de ADN correspondientes al vector digerido y a los insertos a clonar. Finalmente se ligó cada fragmento de ADN con el vector digerido utilizando una relación 1:3 vector/inserto, en un volumen final de 10 μ l en el tampón específico para la enzima, con 0,5 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas). La reacción de ligación se incubó dos horas a temperatura ambiente y luego a 4°C hasta el día siguiente que se transformó en células de *E. coli* electrocompetentes. Las transformaciones se sembraron con espátulas de Drigalsky en placas de LB agar suplementadas con kanamicina.

V.5.11 CLONADO POR RECOMBINACIÓN

Se utilizó la enzima “LR Clonase” del sistema para clonado por recombinación Gateway, según las especificaciones del proveedor (Invitrogen). Las secuencias codificantes clonadas en el vector de entrada (pENTR3C) fueron transferidas al vector de destino de interés (pDEST17, pTcINDEX-GW). Luego se transformaron en células de *E. coli* electrocompetentes y se sembraron con espátula de Drigalsky en placas de LB agar suplementadas con Ampicilina.

V.5.12 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE *E. COLI*

A partir de un cultivo saturado preparado de una colonia aislada se realizó una dilución 1/100 en 300 ml de LB fresco y se creció a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5 a 1. El cultivo se enfrió en hielo por 30 minutos y luego se centrifugó a 4.000 x g por 15 minutos a 4°C. El sedimento celular obtenido se lavó una vez con 300 ml de agua destilada estéril fría, una vez con 150 ml de agua destilada estéril fría, luego con 5 ml de glicerol 10% (v/v) y finalmente se resuspendió en 1 ml de glicerol 10% (v/v). Las células se dividieron en tubos estériles y se guardaron a -70°C hasta su utilización.

V.5.13 TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN

Se colocaron 40 μ l de la suspensión de células competentes con 1 μ l de plásmido o de mezcla de ligación en una celda de electroporación de 0,2 cm de ancho (BioRad) y se electroporó utilizando un voltaje de 1,8 kV con un electroporador BioRad Gene Pulser XCell.

Para recuperar las células se agregó 250 µl de medio LB conteniendo 1% (p/v) glucosa y se incubó 1 h a 37°C. Se sembraron con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB agar suplementado con el antibiótico adecuado según la resistencia de la cepa bacteriana y del plásmido utilizado. Se suplementó además con X-Gal 40 mg/ml e IPTG 1 mM para las ligaciones en los vectores T. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 horas para seleccionar las bacterias transformantes. Después de la transformación se comprobó la presencia del plásmido introducido mediante la técnica de PCR de colonia.

V.5.14 TRANSFECCIÓN DE EPIMASTIGOTES DE *T. CRUZI*

Para cada transfección se cosecharon 2×10^8 parásitos de un cultivo en fase exponencial tardía ($1-5 \times 10^7$ parásitos/ml). Las células se lavaron 1 vez con PBS y se resuspendieron con 350 µl de solución de transfección (0.5 mM MgCl, 0.1 mM CaCl₂ en PBS). Se agregaron 40 µl de DNA plasmídico (15-100 µg), purificado con el sistema comercial “QIAGEN plasmid purification Maxi kit” y se incubó en hielo durante 15 minutos. Finalmente se electroporó en cubetas de 0.2 cm en BioRad Gene Pulser XCell con módulo extensor de capacitancia (CE Module), dando un pulso a 450 V y 500µF. Se recuperaron las células 15 minutos a temperatura ambiente y luego se transfirieron a 5 ml de medio LIT fresco. Junto con cada transfección se incluyó un control negativo con TE que permite monitorear la selección con el antibiótico.

Los parásitos se incubaron durante 24 horas a 28°C y luego se agregó el antibiótico (Geneticina, G418 o Hygromicina) hasta concentración final 50-100 µg/ml para seleccionar los transfectantes. Luego de 48 horas de cultivo, se diluyó 1/5 en medio suplementado con el doble de G418 o Hygromicina, y se continuó creciendo a 28°C durante 5 días. A los 15-30 días posteriores a la transfección los parásitos del control negativo dejaron de crecer y murieron, mientras que los transfectantes se seleccionaron por su resistencia al antibiótico. Los cultivos de parásitos transfectados se subcultivaron diluyendo 1/5 cada 5 o 7 días en medio suplementado con G418 o Hygromicina para continuar el proceso de selección y mantener los cultivos. Las construcciones en pTcINDEX-GW utilizadas para transfectar fueron previamente digeridas con la enzima de restricción *SpeI*, para linealizar el vector y mejorar la eficiencia de recombinación.

BIBLIOGRAFÍA



VI BIBLIOGRAFÍA

Akella, J.S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N.G., Lyons-Abbott, S., Morrissette, N.S., Dougan, S.T., Kipreos, E.T. & Gaertig, J., **2010**. MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature*, 467(7312), pp.218–222.

Allfrey, V.G., Faulkner, R. & Mirsky, A.E., **1964**. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51, pp.786–794.

Allfrey, V.G. & Mirsky, A.E., **1964**. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science*, 144(3618), p.559.

Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhhattar, R., Shilatifard, A., Workman, J. & Zhang, Y., **2007**. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell*, 131(4), pp.633–636.

Andrews, K.T., Tran, T.N., Wheatley, N.C. & Fairlie, D.P., **2009**. Targeting histone deacetylase inhibitors for anti-malarial therapy. *Current topics in medicinal chemistry*, 9(3), pp.292–308.

Aphasizhev, R. & Aphasizheva, I., **2014**. Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. *Biochimie*, 100, pp.125–31.

Atias, A., **2006**. *Parasitologia Medica*, Publicaciones Técnicas Mediterraneo Ltda. Santiago, Chile.

Atkinson, S.J., Soden, P.E., Angell, D.C., Bantscheff, M., Chung, C., Giblin, K.A., Smithers, N., Furze, R.C., Gordon, L., Drewes, G., Rioja, I., Witherington, J., Parr, N.J. & Prinjha, R.K., **2014**. The structure based design of dual HDAC/BET inhibitors as novel epigenetic probes. *MedChemComm*, 5(3), p.342.

Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., Seto, E. & Bhalla, K., **2005**. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *The Journal of biological chemistry*, 280(29), pp.26729–34.

Bamborough, P., Diallo, H., Goodacre, J.D., Gordon, L., Lewis, A., Seal, J.T., Wilson, D.M., Woodrow, M.D. & Chung, C.-W., **2012**. Fragment-based discovery of bromodomain inhibitors part 2: optimization of phenylisoxazole sulfonamides. *Journal of medicinal chemistry*, 55(2), pp.587–96.

Barton, D., Braet, F., Marc, J., Overall, R. & Gardiner, J., **2009**. ELP3 localises to mitochondria and actin-rich domains at edges of HeLa cells. *Neurosci Lett*, 455(1), pp.60–64.

Bastin, P., Pullen, T.J., Moreira-Leite, F.F. & Gull, K., **2000**. Inside and outside of the trypanosome flagellum: A multifunctional organelle. *Microbes and Infection*, 2(15), pp.1865–1874.

Batista, M., Marchini, F.K., Celedon, P. a F., Fragoso, S.P., Probst, C.M., Preti, H., Ozaki, L.S., Buck, G. a, Goldenberg, S. & Krieger, M. a, **2010**. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *BMC microbiology*, 10, p.259.

Baum, S.G., Wittner, M., Nadler, J.P., Horwitz, S.B., Dennis, J.E., Schiff, P.B. & Tanowitz, H.B., **1981**. Taxol, a microtubule stabilizing agent, blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7), pp.4571–5.

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E. & El-Sayed, N.M., **2005**. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733), pp.416–422.

Bonhivers, M., Nowacki, S., Landrein, N. & Robinson, D.R., **2008**. Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. *PLoS Biol*, 6(5), p.e105.

Brachmann, C.B., Sherman, J.M., Devine, S.E., Cameron, E.E., Pillus, L. & Boeke, J.D., **1995**. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev*, 9(23), pp.2888–2902.

Brisse, S., Dujardin, J.C. & Tibayrenc, M., **2000**. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and biochemical parasitology*, 111(1), pp.95–105.

Chagas, C., **1909**. Nova trypanozomiaze humana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, tomo 1, pp.159–218.

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J. V & Mann, M., **2009**. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 325(5942), pp.834–840.

Chung, C.-W., Coste, H., White, J.H., Mirguet, O., Wilde, J., Gosmini, R.L., Delves, C., Magny, S.M., Woodward, R., Hughes, S.A., Boursier, E. V, Flynn, H., Bouillot, A.M., Bamborough, P., Brusq, J.-M.G., Gellibert, F.J., Jones, E.J., Riou, A.M., Homes, P., Martin, S.L., Uings, I.J., Toum, J., Clement, C.A., Boullay, A.-B., Grimley, R.L., Blandel, F.M., Prinjha, R.K., Lee, K., Kirilovsky, J. & Nicodeme, E., **2011**. Discovery and characterization of small molecule inhibitors of the BET family bromodomains. *Journal of medicinal chemistry*, 54(11), pp.3827–38.

Chung, C.-W., Dean, A.W., Woolven, J.M. & Bamborough, P., **2012**. Fragment-based discovery of bromodomain inhibitors part 1: inhibitor binding modes and implications for lead discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 55(2), pp.576–86.

- Ciceri, P., Müller, S., O'Mahony, A., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Hunt, J.P., Lasater, E.A., Pallares, G., Picaud, S., Wells, C., Martin, S., Wodicka, L.M., Shah, N.P., Treiber, D.K. & Knapp, S., **2014**. Dual kinase-bromodomain inhibitors for rationally designed polypharmacology. *Nature chemical biology*, 10(4), pp.305–12.
- Cole, C., Barber, J.D. & Barton, G.J., **2008**. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), pp.W197–201.
- Collins, T.J., **2007**. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 43(1 Suppl), pp.25–30.
- Contreras, V.T., Araujo-Jorge, T.C., Bonaldo, M.C., Thomaz, N., Barbosa, H.S., Meirelles, M. de N. & Goldenberg, S., Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83(1), pp.123–33.
- Contreras, V.T., Araújo-Jorge, T.C. de, Bonaldo, M.C., Thomaz, N., Barbosa, H.S., Meirelles, M. de N.S.L. de & Goldenberg, S., **1988**. Biological aspects of the DM28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83(1), pp.123–133.
- Contreras, V.T., Navarro, M.C., De Lima, A.R., Arteaga, R., Duran, F., Askue, J. & Franco, Y., **2002**. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(8), pp.1213–20.
- Cordero, E.M., Nakayasu, E.S., Gentil, L.G., Yoshida, N., Almeida, I.C. & da Silveira, J.F., **2009**. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of proteome research*, 8(7), pp.3642–52.
- Cribb, P., Perozzi, M., Villanova, G. V, Trochine, A. & Serra, E., **2011**. Characterization of TcHMGB, a high mobility group B family member protein from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*, 41(11), pp.1149–1156.
- Crowley, T.E., Brunori, M., Rhee, K., Wang, X. & Wolgemuth, D.J., **2004**. Change in nuclear-cytoplasmic localization of a double-bromodomain protein during proliferation and differentiation of mouse spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain research. Developmental brain research*, 149(2), pp.93–101.
- Crowley, T.E., Kaine, E.M., Yoshida, M., Nandi, A. & Wolgemuth, D.J., **2002**. Reproductive cycle regulation of nuclear import, euchromatic localization, and association with components of Pol II mediator of a mammalian double-bromodomain protein. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 16(8), pp.1727–37.
- Da Cunha, J.P., Nakayasu, E.S., de Almeida, I.C. & Schenkman, S., **2006**. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. *Mol Biochem Parasitol*, 150(2), pp.268–277.
- Daniels, J.P., Gull, K. & Wickstead, B., **2010**. Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(4), pp.552–569.
- Dantas, A.P., Barbosa, H.S. & De Castro, S.L., **2003**. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 35(3), pp.287–94.

Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, a K. & Zhou, M.M., **1999**. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399(6735), pp.491–496.

Dittmann, A., Werner, T., Chung, C.-W., Savitski, M.M., Fälth Savitski, M., Grandi, P., Hopf, C., Lindon, M., Neubauer, G., Prinjha, R.K., Bantscheff, M. & Drewes, G., **2014**. The commonly used PI3-kinase probe LY294002 is an inhibitor of BET bromodomains. *ACS chemical biology*, 9(2), pp.495–502.

Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P. & Moreno, S.N.J., **2005**. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature reviews. Microbiology*, 3(3), pp.251–61.

Drake, P.J.M., Griffiths, G.J., Shaw, L., Benson, R.P. & Corfe, B.M., **2009**. Application of high-content analysis to the study of post-translational modifications of the cytoskeleton. *Journal of proteome research*, 8(1), pp.28–34.

Ejchel, T.F., Ramirez, M.I., Vargas, N., Azevedo, E.B., Elias, M.C., Zingales, B. & Schenkman, S., **2003**. The largest subunit of the RNA polymerase II of *Trypanosoma cruzi* lacks the repeats in the carboxy-terminal domain and is encoded by several genes. *Parasitology international*, 52(3), pp.243–9.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D. & Andersson, B., **2005**. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), pp.409–415.

Elias, M., da Cunha, J., de Faria, F., Mortara, R., Freymuller, E., Schenkman, S. & Freymüller, E., **2007**. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist*, 158(2), pp.147–157.

Elias, M.C., Nardelli, S.C. & Schenkman, S., **2009**. Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*. *Future Microbiol*, 4(8), pp.1065–1074.

Elias, M.C.Q.B., Vargas, N.S., Zingales, B. & Schenkman, S., **2003**. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 129(1), pp.1–9.

Fedorov, O., Lingard, H., Wells, C., Monteiro, O.P., Picaud, S., Keates, T., Yapp, C., Philpott, M., Martin, S.J., Felletar, I., Marsden, B.D., Filippakopoulos, P., Müller, S., Knapp, S. & Brennan, P.E., **2014**. [1,2,4]triazolo[4,3-a]phthalazines: inhibitors of diverse bromodomains. *Journal of medicinal chemistry*, 57(2), pp.462–76.

Ferguson, F.M., Fedorov, O., Chaikuad, A., Philpott, M., Muniz, J.R.C., Felletar, I., von Delft, F., Heightman, T., Knapp, S., Abell, C. & Ciulli, A., **2013**. Targeting low-druggability bromodomains: fragment based screening and inhibitor design against the BAZ2B bromodomain. *Journal of medicinal chemistry*, 56(24), pp.10183–7.

- Ferreira, L.R.P., Dossin, F. de M., Ramos, T.C., Freymüller, E., Schenkman, S., Dossin Fde, M. & Freymuller, E., **2008**. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *An Acad Bras Cienc*, 80(1), pp.157–166.
- Field, M.C. & Carrington, M., **2009**. The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol*, 7(11), pp.775–786.
- Filippakopoulos, P. & Knapp, S., **2012**. The bromodomain interaction module. *FEBS letters*, 586(17), pp.2692–704.
- Filippakopoulos, P., Picaud, S., Mangos, M., Keates, T., Lambert, J.P., Barsyte-Lovejoy, D., Felletar, I., Volkmer, R., Müller, S., Pawson, T., Gingras, A.C., Arrowsmith, C.H. & Knapp, S., **2012**. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell*, 149(1), pp.214–231.
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W.B., Fedorov, O., Morse, E.M., Keates, T., Hickman, T.T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M.R., Wang, Y., Christie, A.L., West, N., Cameron, M.J., Schwartz, B., Heightman, T.D., La Thangue, N., French, C.A., Wiest, O., Kung, A.L., Knapp, S. & Bradner, J.E., **2010**. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468(7327), pp.1067–73.
- Finkemeier, I., Laxa, M., Miguet, L., Howden, A.J. & Sweetlove, L.J., **2011**. Proteins of diverse function and subcellular location are lysine acetylated in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 155(4), pp.1779–1790.
- Fish, P. V., Filippakopoulos, P., Bish, G., Brennan, P.E., Bunnage, M.E., Cook, A.S., Federov, O., Gerstenberger, B.S., Jones, H., Knapp, S., Marsden, B., Nocka, K., Owen, D.R., Philpott, M., Picaud, S., Primiano, M.J., Ralph, M.J., Sciammetta, N. & Trzupsek, J.D., **2012**. Identification of a chemical probe for bromo and extra C-terminal bromodomain inhibition through optimization of a fragment-derived hit. *Journal of medicinal chemistry*, 55(22), pp.9831–7.
- Frew, A.J., Johnstone, R.W. & Bolden, J.E., **2009**. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer letters*, 280(2), pp.125–33.
- Gadelha, C., Wickstead, B., McKean, P.G. & Gull, K., **2006**. Basal body and flagellum mutants reveal a rotational constraint of the central pair microtubules in the axonemes of trypanosomes. *Journal of cell science*, 119(Pt 12), pp.2405–13.
- Gaertig, J., Cruz, M.A., Bowen, J., Gu, L., Pennock, D.G. & Gorovsky, M.A., **1995**. Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of cell biology*, 129(5), pp.1301–10.
- Garcia, E.S. & Azambuja, P., **1991**. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology today (Personal ed.)*, 7(9), pp.240–4.
- Garcia-Gutierrez, P., Mundi, M. & Garcia-Dominguez, M., **2012**. Association of bromodomain BET proteins with chromatin requires dimerization through the conserved motif B. *Journal of cell science*, 125(Pt 15), pp.3671–80.
- Garcia-Salcedo, J.A., Gijon, P., Nolan, D.P., Tebabi, P., Pays, E., García-Salcedo, J. a & Gijón, P., **2003**. A chromosomal SIR2 homologue with both histone NAD-dependent ADP-ribosyltransferase and deacetylase activities is involved in DNA repair in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*, 22(21), pp.5851–5862.

- Gehling, V.S., Hewitt, M.C., Vaswani, R.G., Leblanc, Y., Côté, A., Nasveschuk, C.G., Taylor, A.M., Harmange, J.-C., Audia, J.E., Pardo, E., Joshi, S., Sandy, P., Mertz, J.A., Sims, R.J., Bergeron, L., Bryant, B.M., Bellon, S., Poy, F., Jayaram, H., Sankaranarayanan, R., Yellapantula, S., Bangalore Srinivasamurthy, N., Birudukota, S. & Albrecht, B.K., **2013**. Discovery, Design, and Optimization of Isoxazole Azepine BET Inhibitors. *ACS medicinal chemistry letters*, 4(9), pp.835–40.
- Gerona-Navarro, G., Yoel-Rodríguez, Mujtaba, S., Frasca, A., Patel, J., Zeng, L., Plotnikov, A.N., Osman, R. & Zhou, M.-M., **2011**. Rational design of cyclic peptide modulators of the transcriptional coactivator CBP: a new class of p53 inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 133(7), pp.2040–3.
- Grellier, P., Sinou, V., Garreau-de Loubresse, N., Bylèn, E., Boulard, Y. & Schrével, J., **1999**. Selective and reversible effects of vinca alkaloids on *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms: blockage of cytokinesis without inhibition of the organelle duplication. *Cell motility and the cytoskeleton*, 42(1), pp.36–47.
- Grisard, E.C., Teixeira, S.M.R., de Almeida, L.G.P., Stoco, P.H., Gerber, A.L., Talavera-López, C., Lima, O.C., Andersson, B., de Vasconcelos, A.T.R. & Talavera-Lopez, C., **2014**. *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome announcements*, 2(1), pp.e01114–13.
- Guerrant, W., Mwakwari, S.C., Chen, P.C., Khan, S.I., Tekwani, B.L. & Oyelere, A.K., **2010**. A structure-activity relationship study of the antimalarial and antileishmanial activities of nonpeptide macrocyclic histone deacetylase inhibitors. *ChemMedChem*, 5(8), pp.1232–5.
- Günzl, A., Bruderer, T., Laufer, G., Schimanski, B., Tu, L.-C., Chung, H.-M., Lee, P.-T. & Lee, M.G.-S., **2003**. RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic cell*, 2(3), pp.542–51.
- Hewings, D.S., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Martin, S., Picaud, S., Tumber, A., Wells, C., Olcina, M.M., Freeman, K., Gill, A., Ritchie, A.J., Sheppard, D.W., Russell, A.J., Hammond, E.M., Knapp, S., Brennan, P.E. & Conway, S.J., **2013**. Optimization of 3,5-dimethylisoxazole derivatives as potent bromodomain ligands. *Journal of medicinal chemistry*, 56(8), pp.3217–27.
- Hewings, D.S., Wang, M., Philpott, M., Fedorov, O., Uttarkar, S., Filippakopoulos, P., Picaud, S., Vuppusetty, C., Marsden, B., Knapp, S., Conway, S.J. & Heightman, T.D., **2011**. 3,5-dimethylisoxazoles act as acetyl-lysine-mimetic bromodomain ligands. *Journal of medicinal chemistry*, 54(19), pp.6761–70.
- Holliday, R., **1987**. The inheritance of epigenetic defects. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4824), pp.163–70.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F. & Yao, T.P., **2002**. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417(6887), pp.455–458.
- Hughes, L.C., Ralston, K.S., Hill, K.L. & Zhou, Z.H., **2012**. Three-dimensional structure of the *Trypanosoma* flagellum suggests that the paraflagellar rod functions as a biomechanical spring. *PLoS one*, 7(1), p.e25700.
- Ingram, A.K. & Horn, D., **2002**. Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei*: two are essential and another is required for normal cell cycle progression. *Mol Microbiol*, 45(1), pp.89–97.

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V, Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B. & Myler, P.J., **2005**. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), pp.436–442.

Jackson, A.P., **2014**. Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology*, pp.1–17.

Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S. & Tjian, R., **2000**. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5470), pp.1422–5.

Janke, C. & Bulinski, J.C., **2011**. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(12), pp.773–786.

Janke, C. & Kneussel, M., **2010**. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci*, 33(8), pp.362–372.

Jeffers, V. & Sullivan Jr., W.J., **2012**. Lysine Acetylation Is Widespread on Proteins of Diverse Function and Localization in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell*, 11(6), pp.735–742.

Jenuwein, T. & Allis, C.D., **2001**. Translating the histone code. *Science*, 293(5532), pp.1074–1080.

Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A. & Yao, T.P., **2003**. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, 115(6), pp.727–38.

Kawahara, T., Siegel, T.N., Ingram, A.K., Alsford, S., Cross, G.A. & Horn, D., **2008**. Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. *Mol Microbiol*, 69(4), pp.1054–1068.

Kelly, J.M., Taylor, M.C., Horn, D., Loza, E., Kalvinsh, I., Björkling, F. & Björkling, F., **2012**. Inhibitors of human histone deacetylase with potent activity against the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Bioorg Med Chem Lett*, 22(5), pp.1886–1890.

Kim, S.C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N. V., White, M., Yang, X.J. & Zhao, Y., **2006**. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*, 23(4), pp.607–618.

- Kleffmann, T., Schmidt, J. & Schaub, G.A., **1998**. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 45(5), pp.548–55.
- Kohl, L. & Gull, K., **1998**. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol Biochem Parasitol*, 93(1), pp.1–9.
- Kollien, A.H. & Schaub, G.A., **1998**. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): influence of starvation. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 45(1), pp.59–63.
- Kollien, A.H. & Schaub, G.A., **2000**. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*, 16(9), pp.381–387.
- Kouzarides, T., **2000**. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J*, 19(6), pp.1176–1179.
- Kouzarides, T., **2007**. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), pp.693–705.
- Kumar, D., Rajanala, K., Minocha, N. & Saha, S., **2012**. Histone H4 lysine 14 acetylation in *Leishmania donovani* is mediated by the MYST-family protein HAT4. *Microbiology*, 158(Pt 2), pp.328–337.
- Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Mophew, M.K., Shaw, M.K., McIntosh, J.R. & Gull, K., **2010**. Basal body movements orchestrate membrane organelle division and cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science*, 123(Pt 17), pp.2884–91.
- Lange, U., Keilholz, W., Schaub, G.A., Landmann, H., Markwardt, F. & Nowak, G., **1999**. Biochemical characterization of a thrombin inhibitor from the bloodsucking bug *Dipetalogaster maximus*. *Haemostasis*, 29(4), pp.204–11.
- Langousis, G. & Hill, K.L., **2014**. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nature reviews. Microbiology*, 12(7), pp.505–18.
- Maity, A.K. & Saha, P., **2012**. The histone acetyl transferase LdHAT1 from *Leishmania donovani* is regulated by S-phase cell cycle kinase. *FEMS microbiology letters*, 336(1), pp.57–63.
- Marciano, D., Maugeri, D.A., Cazzulo, J.J. & Nowicki, C., **2009**. Functional characterization of stage-specific aminotransferases from trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*, 166(2), pp.172–182.
- Martin, M.P., Olesen, S.H., Georg, G.I. & Schönbrunn, E., **2013**. Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib interacts with the acetyl-lysine recognition site of bromodomains. *ACS chemical biology*, 8(11), pp.2360–5.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martínez, L.E., Manning-Cela, R.G., Figueroa-Angulo, E.E., Martínez-Calvillo, S. & Florencio-Martínez, L.E., **2010**. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*, 2010, p.525241.

- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. & Myler, P.J., **2003**. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular cell*, 11(5), pp.1291–9.
- Matthews, K.R., **2005**. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 118(Pt 2), pp.283–290.
- Meslamani, J., Smith, S.G., Sanchez, R. & Zhou, M.-M., **2014**. ChEpiMod: a knowledgebase for chemical modulators of epigenome reader domains. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(10), pp.1481–3.
- Miao, J., Lawrence, M., Jeffers, V., Zhao, F., Parker, D., Ge, Y., Sullivan, W.J. & Cui, L., **2013**. Extensive lysine acetylation occurs in evolutionarily conserved metabolic pathways and parasite-specific functions during *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development. *Molecular microbiology*, 89(4), pp.660–75.
- Ministerio de Salud de la Nación, Presidencia de la Nación. **2012**. Guía para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*. Argentina, 2012.
- Mirguet, O., Lamotte, Y., Chung, C.-W., Bamborough, P., Delannée, D., Bouillot, A., Gellibert, F., Krysa, G., Lewis, A., Witherington, J., Huet, P., Dudit, Y., Trottet, L. & Nicodeme, E., **2014**. Naphthyridines as novel BET family bromodomain inhibitors. *ChemMedChem*, 9(3), pp.580–9.
- Mirguet, O., Lamotte, Y., Donche, F., Toum, J., Gellibert, F., Bouillot, A., Gosmini, R., Nguyen, V.-L., Delannée, D., Seal, J., Blandel, F., Boullay, A., Boursier, E., Martin, S., Brusq, J., Krysa, G., Riou, A., Tellier, R., Costaz, A., Huet, P., Dudit, Y., Trottet, L., Kirilovsky, J., Nicodeme, E. & Delannée, D., **2012**. From ApoA1 upregulation to BET family bromodomain inhibition: discovery of I-BET151. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(8), pp.2963–2967.
- Moreira, D., López-García, P. & Vickerman, K., **2004**. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(Pt 5), pp.1861–75.
- Mujtaba, S., Zeng, L. & Zhou, M.M., **2007**. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene*, 26(37), pp.5521–5527.
- Nakamura, Y., Umehara, T., Nakano, K., Jang, M.K., Shirouzu, M., Morita, S., Uda-Tochio, H., Hamana, H., Terada, T., Adachi, N., Matsumoto, T., Tanaka, A., Horikoshi, M., Ozato, K., Padmanabhan, B. & Yokoyama, S., **2007**. Crystal structure of the human BRD2 bromodomain: insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4. *The Journal of biological chemistry*, 282(6), pp.4193–201.
- Nicodeme, E., Jeffrey, K.L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C.-W., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., White, J., Kirilovsky, J., Rice, C.M., Lora, J.M., Prinjha, R.K., Lee, K. & Tarakhovskiy, A., **2010**. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*, 468(7327), pp.1119–23.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M. & Verdin, E., **2003**. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*, 11(2), pp.437–444.

Ochaya, S., Respuela, P., Simonsson, M., Saraswathi, A., Branche, C., Lee, J., Búa, J., Nilsson, D., Aslund, L., Bontempi, E.J. & Andersson, B., **2007**. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* acetyltransferase: cellular location, activity and structure. *Molecular and biochemical parasitology*, 152(2), pp.123–31.

Ouaissi, M. & Ouaissi, A., **2006**. Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2006(2), p.13474.

Paba, J., Santana, J.M., Teixeira, A.R.L., Fontes, W., Sousa, M. V & Ricart, C.A.O., **2004**. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*, 4(4), pp.1052–9.

Padilla-Mejía, N.E., Florencio-Martínez, L.E., Figueroa-Angulo, E.E., Manning-Cela, R.G., Hernández-Rivas, R., Myler, P.J. & Martínez-Calvillo, S., **2009**. Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in *Trypanosomatid* parasites. *BMC genomics*, 10, p.232.

Parmigiani, R.B., Xu, W.S., Venta-Perez, G., Erdjument-Bromage, H., Yaneva, M., Tempst, P. & Marks, P. a, **2008**. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), pp.9633–8.

Perdiz, D., Mackeh, R., Pous, C., Baillet, A. & Poüs, C., **2011**. The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal*, 23(5), pp.763–771.

Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Kelly, J.M., Wilkinson, S.R. & Radi, R., **2008**. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *The Biochemical journal*, 410(2), pp.359–68.

Picaud, S., Da Costa, D., Thanasopoulou, A., Filippakopoulos, P., Fish, P. V, Philpott, M., Fedorov, O., Brennan, P., Bunnage, M.E., Owen, D.R., Bradner, J.E., Taniere, P., O'Sullivan, B., Müller, S., Schwaller, J., Stankovic, T. & Knapp, S., **2013a**. PFI-1, a highly selective protein interaction inhibitor, targeting BET Bromodomains. *Cancer research*, 73(11), pp.3336–46.

Picaud, S., Wells, C., Felletar, I., Brotherton, D., Martin, S., Savitsky, P., Diez-Dacal, B., Philpott, M., Bountra, C., Lingard, H., Fedorov, O., Müller, S., Brennan, P.E., Knapp, S. & Filippakopoulos, P., **2013b**. RVX-208, an inhibitor of BET transcriptional regulators with selectivity for the second bromodomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(49), pp.19754–9.

Piñeyro, M.D., Arcari, T., Robello, C., Radi, R. & Trujillo, M., **2011**. Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Archives of biochemistry and biophysics*, 507(2), pp.287–95.

Piperno, G. & Fuller, M.T., **1985**. Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J Cell Biol*, 101(6), pp.2085–2094.

Piperno, G., LeDizet, M. & Chang, X.J., **1987**. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *The Journal of cell biology*, 104(2), pp.289–302.

- Povelones, M.L., Gluenz, E., Dembek, M., Gull, K. & Rudenko, G., **2012**. Histone H1 plays a role in heterochromatin formation and VSG expression site silencing in *Trypanosoma brucei*. *PLoS pathogens*, 8(11), p.e1003010.
- Prinjha, R.K., Witherington, J. & Lee, K., **2012**. Place your BETs: the therapeutic potential of bromodomains. *Trends in pharmacological sciences*, 33(3), pp.146–53.
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J. & Verhey, K.J., **2006**. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current biology: CB*, 16(21), pp.2166–72.
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A. & Aslund, L., **2008**. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry*, 283(23), pp.15884–92.
- Robinson, D.R., Sherwin, T., Ploubidou, a, Byard, E.H. & Gull, K., **1995**. Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *The Journal of cell biology*, 128(6), pp.1163–72.
- Sachchidanand, Resnick-Silverman, L., Yan, S., Mutjaba, S., Liu, W.-J., Zeng, L., Manfredi, J.J. & Zhou, M.-M., **2006**. Target structure-based discovery of small molecules that block human p53 and CREB binding protein association. *Chemistry & biology*, 13(1), pp.81–90.
- Sadoul, K., Wang, J., Diagouraga, B. & Khochbin, S., **2011**. The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, p.970382.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., **1989**. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 1*, Cold Spring Harbor laboratory Press.
- Sanchez, R., Meslamani, J. & Zhou, M.-M., **2014**. The Bromodomain: From Epigenome Reader to Druggable Target. *Biochimica et biophysica acta*.
- Sanchez, R. & Zhou, M.M., **2009**. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12(5), pp.659–665.
- Sasse, R. & Gull, K., **1988**. Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 90 (Pt 4), pp.577–589.
- Schneider, a, Sherwin, T., Sasse, R., Russell, D.G., Gull, K. & Seebeck, T., **1987**. Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei brucei* contain the same alpha-tubulin isoforms. *The Journal of cell biology*, 104(3), pp.431–8.
- Seal, J., Lamotte, Y., Donche, F.F., Bouillot, A., Mirguet, O., Gellibert, F.F., Nicodeme, E., Krysa, G., Kirilovsky, J., Beinke, S., McCleary, S., Rioja, I., Bamborough, P., Chung, C.-W.W., Gordon, L., Lewis, T., Walker, A.L., Cutler, L., Lugo, D., Wilson, D.M., Witherington, J., Lee, K. & Prinjha, R.K., **2012**. Identification of a novel series of BET family bromodomain inhibitors: Binding mode and profile of I-BET151 (GSK1210151A). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(8), pp.2968–2972.

- Sereno, D., Vergnes, B., Mathieu-Daude, F., Cordeiro da Silva, a & Ouaisi, a, **2006**. Looking for putative functions of the *Leishmania* cytosolic SIR2 deacetylase. *Parasitology research*, 100(1), pp.1–9.
- Shida, T., Cueva, J.G., Xu, Z., Goodman, M.B. & Nachury, M. V, **2010**. The major {alpha}-tubulin K40 acetyltransferase {alpha}TAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Siegel, T.N., Hekstra, D.R., Kemp, L.E., Figueiredo, L.M., Lowell, J.E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S. & Cross, G.A.M., **2009**. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev*, 23(9), pp.1063–1076.
- Siegel, T.N., Kawahara, T., Degrasse, J.A., Janzen, C.J., Horn, D. & Cross, G.A., **2008**. Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, 67(4), pp.762–771.
- Simpson, A.G.B., Stevens, J.R. & Lukes, J., **2006**. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in parasitology*, 22(4), pp.168–74.
- Singh, N., Lorbeck, M.T., Zervos, A., Zimmerman, J. & Elefant, F., **2010**. The histone acetyltransferase Elp3 plays in active role in the control of synaptic bouton expansion and sleep in *Drosophila*. *Journal of neurochemistry*, 115(2), pp.493–504.
- Solinger, J. a, Paolinelli, R., Kloss, H., Scorza, F.B., Marchesi, S., Sauder, U., Mitsushima, D., Capuani, F., Sturzenbaum, S.R., Cassata, G., Klöss, H. & Stürzenbaum, S.R., **2010**. The *Caenorhabditis elegans* Elongator complex regulates neuronal alpha-tubulin acetylation. *PLoS Genet*, 6(1), p.e1000820.
- Souto-Padron, T., Cunha e Silva, N.L. & de Souza, W., **1993**. Acetylated alpha-tubulin in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization. ... *do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(4), pp.517–528.
- Souza, R.T., Lima, F.M., Barros, R.M., Cortez, D.R., Santos, M.F., Cordero, E.M., Ruiz, J.C., Goldenberg, S., Teixeira, M.M.G. & da Silveira, J.F., **2011**. Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PloS one*, 6(8), p.e23042.
- De Souza, W., **2002a**. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*, 8(4), pp.269–285.
- De Souza, W., **2002b**. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid biology and disease*, 1(1), p.3.
- De Souza, W., **2009**. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl(May), pp.89–100.
- Spadillero, B., Sánchez, F., Slezzynger, T.C. & Henríquez, D.A., **2002**. Differences in the nuclear chromatin among various stages of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of cellular biochemistry*, 84(4), pp.832–9.
- Stevens, J.R., **2008**. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*, 15(3), pp.226–232.

- Szyk, A., Deaconescu, A.M., Spector, J., Goodman, B., Valenstein, M.L., Ziolkowska, N.E., Kormendi, V., Grigorieff, N. & Roll-Mecak, A., **2014**. Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell*, 157(6), pp.1405–15.
- Tavares, J., Ouaiissi, A., Santarém, N., Sereno, D., Vergnes, B., Sampaio, P., Cordeiro-da-Silva, A. & Santarem, N., **2008**. The *Leishmania infantum* cytosolic SIR2-related protein 1 (LiSIR2RP1) is an NAD⁺-dependent deacetylase and ADP-ribosyltransferase. *The Biochemical journal*, 415(3), pp.377–86.
- Taylor, M.C. & Kelly, J.M., **2006**. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. *BMC Biotechnol*, 6, p.32.
- Ullu, E., Tschudi, C. & Chakraborty, T., **2004**. RNA interference in protozoan parasites. *Cellular microbiology*, 6(6), pp.509–19.
- Umehara, T., Nakamura, Y., Jang, M.K., Nakano, K., Tanaka, A., Ozato, K., Padmanabhan, B. & Yokoyama, S., **2010**. Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain. *The Journal of biological chemistry*, 285(10), pp.7610–8.
- Vanagas, L., Jeffers, V., Bogado, S.S., Dalmasso, M.C., Sullivan, W.J. & Angel, S.O., **2012**. Toxoplasma histone acetylation remodelers as novel drug targets. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(10), pp.1189–201.
- Vedrenne, C., Giroud, C., Robinson, D.R., Besteiro, S., Bosc, C., Bringaud, F. & Baltz, T., **2002**. Two Related Subpellicular Cytoskeleton-associated Proteins in *Trypanosoma brucei* Stabilize Microtubules. *Mol. Biol. Cell*, 13(3), pp.1058–1070.
- Verhey, K.J. & Gaertig, J., **2007**. The tubulin code. *Cell Cycle*, 6(17), pp.2152–2160.
- Vidler, L.R., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Picaud, S., Martin, S., Tomsett, M., Woodward, H., Brown, N., Knapp, S. & Hoelder, S., **2013**. Discovery of novel small-molecule inhibitors of BRD4 using structure-based virtual screening. *Journal of medicinal chemistry*, 56(20), pp.8073–88.
- Villanova, G. V., Nardelli, S.C., Cribb, P., Magdaleno, A., Silber, A.M., Motta, M.C., Schenkman, S. & Serra, E., **2009**. *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation. *Int J Parasitol*, 39(6), pp.665–673.
- Waddington, C.H., **1939**. Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 25(7), pp.299–307.
- Wang, Q.-P., Kawahara, T. & Horn, D., **2010a**. Histone deacetylases play distinct roles in telomeric VSG expression site silencing in African trypanosomes. *Molecular microbiology*, 77(5), pp.1237–45.
- Wang, Q., Zhang, Y., Yang, C., Xiong, H., Lin, Y., Yao, J., Li, H., Xie, L., Zhao, W., Yao, Y., Ning, Z.-B.B., Zeng, R., Xiong, Y., Guan, K.-L.L., Zhao, S. & Zhao, G.-P.P., **2010b**. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science*, 327(5968), pp.1004–1007.

- Weinert, B.T., Wagner, S.A., Horn, H., Henriksen, P., Liu, W.R., Olsen, J. V, Jensen, L.J. & Choudhary, C., **2011**. Proteome-wide mapping of the Drosophila acetylome demonstrates a high degree of conservation of lysine acetylation. *Sci Signal*, 4(183), p.ra48.
- World Health Organization (WHO), **2012**. Technical report: *Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis*.
- Wilkinson, S.R., Temperton, N.J., Mondragon, a & Kelly, J.M., **2000**. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry*, 275(11), pp.8220–5.
- Wong, N.C., **2007**. Novel therapies to increase apolipoprotein AI and HDL for the treatment of atherosclerosis. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 8(9), pp.718–28.
- Woods, K., Nic a'Bhaird, N., Dooley, C., Perez-Morga, D. & Nolan, D.P., **2013**. Identification and Characterization of a Stage Specific Membrane Protein Involved in Flagellar Attachment in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE*, 8(1), p.e52846.
- Xie, L., Wang, X., Zeng, J., Zhou, M., Duan, X., Li, Q., Zhang, Z., Luo, H., Pang, L., Li, W., Liao, G., Yu, X., Li, Y., Huang, H. & Xie, J., **2014**. Proteome-wide Lysine Acetylation Profiling of the Human Pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *The international journal of biochemistry & cell biology*.
- Yang, X.J., **2004**. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays*, 26(10), pp.1076–1087.
- Yang, X.J. & Seto, E., **2008**. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(3), pp.206–218.
- Yoshida, N., **2006**. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(1), pp.87–111.
- Yu, B.J., Kim, J.A., Moon, J.H., Ryu, S.E. & Pan, J.G., **2008**. The diversity of lysine-acetylated proteins in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 18(9), pp.1529–1536.
- Yuan, H. & Marmorstein, R., **2013**. Histone acetyltransferases: Rising ancient counterparts to protein kinases. *Biopolymers*, 99(2), pp.98–111.
- Zeng, L., Li, J., Muller, M., Yan, S., Mujtaba, S., Pan, C., Wang, Z. & Zhou, M.-M., **2005**. Selective small molecules blocking HIV-1 Tat and coactivator PCAF association. *Journal of the American Chemical Society*, 127(8), pp.2376–7.
- Zeng, L. & Zhou, M.M., **2002**. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett*, 513(1), pp.124–128.
- Zhang, G., Plotnikov, A.N., Rusinova, E., Shen, T., Morohashi, K., Joshua, J., Zeng, L., Mujtaba, S., Ohlmeyer, M. & Zhou, M.-M., **2013a**. Structure-guided design of potent diazobenzene inhibitors for the BET bromodomains. *Journal of medicinal chemistry*, 56(22), pp.9251–64.

Zhang, X., Shen, Y., Ding, G., Tian, Y., Liu, Z., Li, B., Wang, Y. & Jiang, C., **2013b**. TFPP: an SVM-based tool for recognizing flagellar proteins in *Trypanosoma brucei*. H. Tang, ed. *PLoS one*, 8(1), p.e54032.

Zhang, J., Sprung, R., Pei, J., Tan, X., Kim, S., Zhu, H., Liu, C.F., Grishin, N. V & Zhao, Y., **2009**. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics*, 8(2), pp.215–225.

Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J.T., Yang, X.-J., Dent, S.R., Yao, T.-P., Lane, W.S. & Seto, E., **2007**. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Molecular cell*, 27(2), pp.197–213.

Zhao, L., Cao, D., Chen, T., Wang, Y., Miao, Z., Xu, Y., Chen, W., Wang, X., Li, Y., Du, Z., Xiong, B., Li, J., Xu, C., Zhang, N., He, J. & Shen, J., **2013**. Fragment-based drug discovery of 2-thiazolidinones as inhibitors of the histone reader BRD4 bromodomain. *Journal of medicinal chemistry*, 56(10), pp.3833–51.

Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S.M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y. & Guan, K.-L.L., **2010**. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*, 327(5968), pp.1000–1004.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M. & Schijman, A.G., **2009**. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), pp.1051–4.

Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M.G., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G. & Sturm, N.R., **2012**. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), pp.240–53.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil que todos los que participaron directa o indirectamente de este trabajo entren en una sola página. Muchas personas me acompañaron durante este proceso, a muchos los conocí durante esta etapa y se crearon lazos que estoy segura van a perdurar toda la vida.

El agradecimiento principal es a Esteban, jefe como pocos, que sabe guiar, acompañar y promover un ambiente de trabajo único.

Pame y Car, el gracias me queda chico!!!! Las adoro!!

A las nuevas/viejas incorporaciones al Bromo team: Lucho, Romi, Isa y Vir, es un placer compartir con ustedes todos los días.

Al Hemo team: Juli, Marce, Lucas y Bren. Gracias por el apoyo científico y personal. Se armó un grupo muy lindo y estoy orgullosa de formar parte de él.

A Lu y Cele, cable a tierra desde que eramos estudiantes de licenciatura. Gracias por seguir aguantándome!!!!

Obviamente otro agradecimiento obligado es a mi familia, que aunque a veces no entienda que hago todos los días, me bancan incondicionalmente.

Finalmente, gracias a Marce y Abril por soportarme en casa, siempre tirando para el mismo lado. Estoy feliz por esta nueva familia que estamos empezando a armar juntos.

