



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

UNAM  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
CAMPO 1



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

Obtención de transfectantes estables de  
células MDCK con pEGFP-Actin<sup>-</sup> y  
pEGFP-- Actin<sup>m</sup>.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

**CABRERA HERNANDEZ JULIO CESAR**

ASESORES: DRA. REBECA G. MANNING CELA  
DRA. GILDA FLORES ROSALES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2005

m. 344941



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Obtención de transfectantes estables de células MCK con pEGFP-Actin (-) y pEGFP-Actin (m).

que presenta el pasante: Julio César Cabrera Hernández  
con número de cuenta: 09724326-9 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Enero de 2005

PRESIDENTE	<u>Dra. Gilda Flores Rosales</u>	
VOCAL	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFI. Guadalupe Koizumi Castro</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Dra. Norma L. Delgado Buenrostro</u>	



Esta tesis fue realizada en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el departamento de Biomedicina Molecular dentro del programa de Biología Celular y Molecular de Parásitos bajo la dirección de la Dra. Rebeca Georgina Manning Cela.

---

---

## Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por darme la oportunidad de nacer, crecer y llegar con salud a este día.

Agradezco infinitamente a la Universidad Nacional Autónoma de México que a través de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán me haya abierto sus puertas y permitido formarme profesionalmente.

Mi eterno agradecimiento a la Dra. Rebeca G. Manning Cela por mostrarme el camino de la ciencia y por darme la oportunidad de pertenecer a su proyecto de investigación y equipo de trabajo, por la paciencia, la atención y sobre todo por la excelente dirección y el tiempo brindado para la realización de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a la QFB. Claudia Márquez Dueñas por su ayuda, asesoría técnica y experimental durante el desarrollo del trabajo de tesis.

Del mismo modo agradezco al Técnico José Isaías Carrasco "Don Pedro" por su ayuda técnica, disposición y compromiso en su trabajo para que el material limpio nunca falte y el trabajo del laboratorio nunca se vea truncado.

A la Dra. Gilda Flores Rosales por el tiempo dedicado en la revisión y corrección de este trabajo, pero principalmente por sus enseñanzas y por activar los genes que me hacen sentir la pasión hacia la bioquímica y la genética.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por ser una verdadera maestra de las ciencias, por sus grandes consejos académicos y personales y por brindarme su tiempo a pesar de sus múltiples ocupaciones.

A la QFB. Maria Esther Revuelta Miranda porque a pesar de tener la agenda saturada, siempre tiene tiempo, consejos y palabras de superación personal para sus alumnos.

A la QFI. Guadalupe Koizumi Castro y a la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro por el tiempo dedicado para la revisión y corrección de esta tesis.

A la M. en C. Andrea Becerril Osnaya por permitir conocerla académica y personalmente, sobre todo por demostrarme que el éxito académico y profesional en nada esta peleado con el éxito personal y social.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, mi agradecimiento muy especial a Marisa por su contribución directa en el trabajo experimental, a Claudia y a la Dra. Janeth por su asesoría y su gran disposición a colaborar, a Norma, Angélica, Gil, David, Chucho, Luis Enrique, Luis Alberto y don Pedro, quienes crearon un buen ambiente de amistad y que con su optimismo, sonrisas y compañerismo logramos superar momentos difíciles en el laboratorio.

A mi tocayito Julio Cordero, Israel, Januz, los dos Horacios por brindarme su amistad y por esos momentos dentro de la cancha en los partidos del F. C. Biomedicina.

A mis compañeros de la Universidad Paty, Azucena, Maritere por esos largos días de estudio y su apoyo durante toda la carrera. A Maritza, Dorís, Jhonny, Vadillo, todos ellos orgullosamente 27's y a Agustín que pertenece a todas las generaciones.

A mi gran amigo Jorge Hernández por entenderme y acompañarme por este largo camino que es la vida.

---

---

## Dedicatorias

Esta tesis esta dedicada a todos mis esfuerzos, sacrificios y desvelos sufridos durante toda mi vida académica, también la dedico a la perseverancia, entereza y sabiduría para mantenerme firme en mis objetivos cuando todo parecía estar en mi contra.

No sólo la tesis, sino mi vida entera se las dedico a mis padres Petra Hernandez Contreras y Agustín Cabrera Parra, a quienes tengo mucho que agradecer y nada que pedir ya que ellos construyeron mi vida, marcaron el camino a seguir y que además siempre respaldaron y apoyaron mis decisiones, LOS AMO.

A mis hermanos Luis Antonio y Dolores Aída, esperando que este sea un claro ejemplo de que cuando se quieren realizar bien las cosas ninguna barrera es tan alta como para no vencerla, ánimo y sé que ustedes podrán darle la misma alegría a nuestros padres que todo se lo merecen, también LOS AMO.

A mis abuelitos José Cabrera y Dolores Parra, por confiar en mi y siempre creer que esto iba a ser posible, gracias por su apoyo y confianza, espero nunca defraudarlos, LOS AMO.

A mi abuelita Margarita y a mi abuelito Fabián<sup>1</sup> quienes a pesar de vivir lejos de mi siempre estuvieron muy cerca, LOS AMO.

A toda mi familia tíos, tías, primos, primas, sobrinos y sobrinas, por creer en mi y hacerme sentir alguien importante en sus vidas, muchas gracias a todos, LOS AMO.

A la persona que ha llenado de alegrías mi vida, a quien sin ser de mi familia (espero que algún día lo sea) ha logrado convertirse en una de las personas más importantes de mi vida. Por estar siempre a mi lado, por ayudarme a cargar el mundo cuando más pesado se me hacía, por no permitir que me quedara atrás cuando todos avanzaban, sobre todo por el enorme sacrificio que haz hecho por mí, y porque te prometí que haríamos que valiera la pena y sabes que este es el primer paso para lograr nuestros objetivos, quiero dedicarte este trabajo, este esfuerzo, esta alegría a ti mi vida MARITERE DOMINGUEZ ROJAS, sabes que TE AMO y que tú significas todo para mí, eres la vida que el señor me dio, eres un ángel que bajo, y que yo estaba solo esperándote para entregarte mi amor.

---

---

# Índice

<b>Lista de abreviaturas</b> -----	i
<b>Índice de tablas y figuras</b> -----	ii
<b>Resumen</b> -----	iii
<b>Introducción</b> -----	1
<i>Trypanosoma cruzi</i> -----	1
Morfología-----	2
Ciclo biológico-----	3
Mecanismo de infección-----	5
Participación del citoesqueleto de actina en el proceso de infección de <i>T. cruzi</i> -----	6
Citoesqueleto-----	9
Citoesqueleto de actina-----	10
Isoformas de actina-----	12
Proteínas asociadas a actina-----	14
Timosina $\beta$ 4-----	16
DNAsa I-----	16
Profilina-----	16
Cofilina-----	17
Cap Z-----	17
Tropomodulina-----	18
Gelsolina-----	18
Arp2/3-----	18
$\alpha$ -actinina-----	19
Fimbrina-----	19
Miosina-----	19

---

---

Tropomiosina -----	20
Línea celular MDCK -----	20
Transfección de células eucariotas -----	23
Características de ADN exógeno o inserto -----	24
Características del ADN vector -----	25
Características de la célula receptora -----	27
Métodos de transfección -----	28
Proteína Verde Fluorescente (GFP)-----	30
<b>Antecedentes directos -----</b>	<b>35</b>
<b>Justificación -----</b>	<b>36</b>
<b>Objetivos -----</b>	<b>37</b>
<b>Esquema experimental -----</b>	<b>38</b>
<b>Materiales y métodos -----</b>	<b>39</b>
Plásmidos-----	40
Transformación -----	40
Obtención y extracción del ADN de plásmido por CsCl-----	41
Electroforesis en geles de agarosa -----	42
Digestión con enzimas de restricción -----	42
Cultivos celulares -----	43
Transfección de células MDCK-----	43
Clonación de células transfectadas de manera estable -----	45
Tinción de F-actina con faloidina rodaminada -----	45
Extracción y cuantificación de proteínas totales-----	46
Electroforesis de proteínas SDS-PAGE -----	47
Inmunotransferencia-----	47
Infección de fibroblastos 3T3 (NIH y S) y epitelios (MDCK y RK13), con los tres estadios de desarrollo de <i>T. cruzi</i> . -----	48

---



---

Infección de células MDCK con los tres estadios de desarrollo de <i>T. cruzi</i> .....	49
Procesamiento de imágenes .....	49
Colocalización .....	49
<b>Resultados</b> .....	50
Transfección y expresión de actina fluorescente en células MDCK transfectadas .....	52
Organización del citoesqueleto de actina en células transfectadas con pEGFP-Actin <sup>m</sup> , pEGFP-Actin <sup>r</sup> y pEGFP-Actin .....	54
Niveles de expresión de la proteína de $\beta$ -actina exógena en células MDCK transfectadas con pEGFP-Actin y pEGFP-Actin <sup>m</sup> .....	58
Cinética de infección de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> en dos líneas de células epiteliales (MDCK y RK13) y dos líneas de fibroblastos 3T3 (S y NIH). .....	62
Cinética de infección de células MDCK con los diferentes estadios de desarrollo de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	64
<b>Discusión</b> .....	66
<b>Conclusiones</b> .....	73
<b>Bibliografía</b> .....	74
<b>Apéndice</b> .....	81
Mapa de restricción de pEGFP-Actin .....	81
Mapa de restricción de pEGFP-Actin <sup>m</sup> .....	82
Mapa de restricción de pEGFP-Actin <sup>r</sup> .....	83
Secuencia completa del plásmido original pEGFP-Actin .....	84

---

---

## Lista de Abreviaturas

<b>µg</b>	Microgramos
<b>µl</b>	Microlitros
<b>A<sup>+</sup></b>	Proteína verde fluorescente fusionada a β-actina exógena
<b>ABPs</b>	Proteínas de unión a actina ( <i>Actin Binding Protein</i> )
<b>ADNc</b>	cDNA (Ácido Desoxirribonucleico complementario)
<b>ADP</b>	Adenosin Difosfato
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>Ca-Pi</b>	Co-precipitación por fosfato de calcio
<b>CD</b>	Citocalacina D
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>cols</b>	Colaboradores
<b>C-terminal</b>	Carbono terminal
<b>DEAE-dextran</b>	Dietilaminoetil-dextran
<b>DMEM</b>	Medio esencial mínimo Dulbecco ( <i>Dulbecco Minimum Essential Medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente aumentada (Enhanced Green Fluorescent Protein)
<b>EtBr</b>	Bromuro de etidio
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FACS</b>	Citómetro de flujo ( <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> )
<b>F-actina</b>	Actina filamentosa
<b>G-actina</b>	Actina globular
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GFP</b>	Proteína Verde Fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>hr (s)</b>	Hora (s)
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>KD</b>	Kilodaltones
<b>LB</b>	Medio Luria ( <i>Luria broth</i> )
<b>MDCK</b>	Células de riñón canino Madin-Darby ( <i>Madin Darby Canine Kidney</i> )
<b>Mock</b>	Células control que solo expresan a la EGFP
<b>Mut</b>	Mutada
<b>nc</b>	Nucleótidos
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>N-terminal</b>	Amino terminal
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>pEGFP-Actin</b>	Plásmido de la proteína verde fluorescente fusionada a β-actina exógena.
<b>pEGFP-Actin<sup>-</sup></b>	Plásmido de la proteína verde fluorescente sin la fusión a β-actina exógena.
<b>pEGFP-Actin<sup>m</sup></b>	Plásmido de la proteína verde fluorescente fusionada a β-actina exógena mutada.
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>T° amb</b>	Temperatura ambiente
<b>WT</b>	Tipo silvestre ( <i>Wilde Type</i> )

---

## Índice de tablas y figuras

<b>Tabla 1</b>	Lista de reactivos y sus componentes utilizados-----	39
<b>Tabla 2</b>	Porcentaje de células fluorescentes y viabilidad durante la primera y segunda selección post-transfección-----	52
<b>Tabla 3</b>	Comportamiento celular en cultivo. -----	58
<b>Figura 1</b>	Morfología de <i>T. cruzi</i> -----	2
<b>Figura 2</b>	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> -----	4
<b>Figura 3</b>	Invasión de <i>T. cruzi</i> -----	6
<b>Figura 4</b>	Mecanismos sugeridos para la entrada del <i>T. cruzi</i> a la célula hospedera -----	9
<b>Figura 5</b>	ADN de plásmido de pEGFP-Actin <sup>m</sup> , pEGFP-Actin <sup>r</sup> y pEGFP-Actin <sup>n</sup> ----	50
<b>Figura 6</b>	Patrón de restricción de los plásmidos pEGFP-Actin <sup>n</sup> , pEGFP-Actin <sup>r</sup> y pEGFP-Actin <sup>m</sup> . -----	51
<b>Figura 7</b>	Expresión de la proteína verde fluorescente en células MDCK -----	53
<b>Figura 8</b>	Distribución de los filamentos de actina en células MDCK transfectadas con pEGFP-Actin <sup>r</sup> , pEGFP-Actin <sup>n</sup> y pEGFP-Actin <sup>m</sup> . -----	55
<b>Figura 9</b>	Alteración morfológica de células Mut con respecto a células control Mock, A <sup>+</sup> y WT. -----	56
<b>Figura 10</b>	Organización de filamentos de actina en células MDCK Mut con respecto a los controles WT, A <sup>+</sup> y Mock. -----	57
<b>Figura 11</b>	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry. -----	58
<b>Figura 12</b>	Extracto total de proteínas de las células WT y transfectadas. -----	59
<b>Figura 13</b>	Inmunotransferencia de $\beta$ -actina endógena y exógena en células WT y transfectadas. -----	60
<b>Figura 14</b>	Expresión de $\beta$ -actina endógena y exógena. -----	61
<b>Figura 15</b>	Cinética de infección en fibroblastos 3T3 (NIH y S) y epitelios (MDCK y RK13). -----	62
<b>Figura 16</b>	Cinética de infección con epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes en cuatro líneas celulares. -----	63
<b>Figura 17</b>	Cinética de infección de epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes y en células MDCK.-----	65

---

## Resumen

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas caracterizándose por ser un parásito intracelular obligado que afecta a una gran diversidad de células de mamífero. La participación del citoesqueleto de actina en el proceso de infección de este parásito ha sido motivo de discusión. Algunos autores han reportado que el proceso de infección es dependiente de actina mientras que otros autores coinciden en que es independiente de microfilamentos. La controversia de los resultados podría deberse a diferentes causas como: a) la distinta susceptibilidad a la infección de las líneas celulares utilizadas, b) el uso de drogas que desorganizan el citoesqueleto de actina, c) que estas drogas pudieran afectar tanto a la célula como al parásito, d) a las diversas cepas de parásitos utilizadas y e) a la presencia de diversos mecanismos que pudieran estar presentes de manera simultánea. Las estrategias hasta ahora utilizadas son indirectas lo que dificulta la interpretación de los resultados; por ello, en el presente trabajo planteamos el desarrollar herramientas moleculares que permitan estudiar la participación del citoesqueleto de actina durante el proceso de infección de *T. cruzi* de manera directa. En un trabajo previo del laboratorio se obtuvieron células MDCK transfectadas de manera estable expresando a  $\beta$ -actina fusionada a la proteína verde fluorescente ( $A^+$ ). Siguiendo esta línea, en este trabajo obtuvimos células MDCK transfectadas de manera estable expresando a una  $\beta$ -actina truncada fusionada a la proteína verde fluorescente (Mut) y células control expresando únicamente a la proteína verde fluorescente (Mock).

El análisis de las transfectantes  $A^+$  mostró una co-localización de la actina exógena con la endógena en los filamentos de actina, fibras de estrés, microvellosidades y el anillo cortical no mostrando cambios en su fenotipo con respecto a las células control (no transfectadas y Mock). Las células que expresan a la  $\beta$ -actina exógena truncada, presentan un citoesqueleto de actina alterado y un fenotipo consistente con una mutante dominante negativa. Como era de esperarse las células Mock se comportaron igual que las células silvestres (WT). El análisis por inmunotransferencia indicó que en las células Mut la  $\beta$ -actina endógena disminuye sus niveles de expresión aparentemente como resultado de la expresión de actina exógena truncada. Por otro lado las células  $A^+$  y Mock mostraron los mismos niveles de  $\beta$ -actina endógena que las células silvestres.

Resultados preliminares de infección utilizando estadios de desarrollo de *T. cruzi* mostraron índices de infección disminuidos para epimastigotes y tripomastigotes y aumentado para amastigotes utilizando células Mut, sugiriendo que este proceso es dependiente e independiente del citoesqueleto de actina, respectivamente.

## Introducción

Muchas enfermedades infecciosas son provocadas por microorganismos patógenos que utilizan células hospederas para poder llevar a cabo su ciclo biológico entre los cuales se encuentran bacterias, hongos, virus y parásitos. Por ello es importante el estudio de los procesos de invasión e infección de células huésped.

Los patógenos intracelulares subvierten los procesos de la célula hospedera normales para crear un nicho especializado que refuerza su supervivencia. Un blanco de algunos patógenos es el citoesqueleto de la célula hospedera que es utilizado por estos patógenos para propósitos que incluyen la unión, la entrada en las células, el movimiento dentro y entre las células, la formación y remodelación de vacuolas, y anulación de fagocitosis. El conocimiento de estos procesos ha aumentado en los años recientes y no sólo ha contribuido a una comprensión mayor de las causas moleculares de enfermedades infecciosas ocasionadas por patógenos intracelulares, sino también ha revelado principios fundamentales de las funciones normales del citoesqueleto (Gruenheid y Finlay, 2003).

Uno de estos patógenos intracelulares es el protozoo *Trypanosoma cruzi* el cual es un microorganismo eucariota unicelular flagelado y parásito de un amplio rango de seres vivos, desde insectos hasta mamíferos, incluidos los seres humanos. Causa la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, que afecta aproximadamente a 20 millones de personas a nivel mundial. De acuerdo con los datos del Banco Mundial, en 1993 se estableció que la enfermedad de Chagas en Latinoamérica ocupa el primer lugar entre las enfermedades tropicales y el cuarto entre las enfermedades transmisibles (Morel, 1999). En México se han confirmado más de 400 casos agudos en los 23 estados situados al sur del Trópico de Cáncer.

### ***Trypanosoma cruzi***

En 1909, realizando estudios sobre paludismo en Brasil, Carlos Chagas descubrió el *Trypanosoma cruzi* en el intestino de un hemíptero del género *Triatoma* (Chinche holicona), el *Panstrongylus megistus*. Posteriormente Carlos Chagas encontró el mismo tripanosoma en la sangre de un niño que tenía fiebre, anemia y linfadenopatía y demostró que este parásito era la causa de una enfermedad endémica en Brasil.



## Morfología

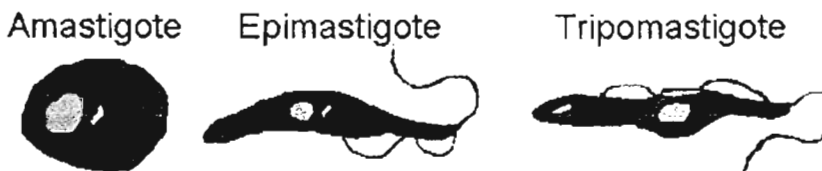
El *Trypanosoma cruzi* es un protozooario que se clasifica dentro del phylum *Sarcomastigophora* y pertenece a la clase *Zoomastigophora* del orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae*.

El *Trypanosoma cruzi* es un organismo pleomórfico que durante su ciclo de vida presenta distintas fases morfológicas de las cuales se han caracterizado principalmente tres estadios:

1.- Amastigote: Forma intracelular de cuerpo esférico u oval que se encuentra en tejidos del hospedero mamífero. Se multiplica por fisión binaria, posee un núcleo grande esférico, un cinetoplasto en forma de bastón y un flagelo muy corto que a veces no es visible, mide de 1.5-5  $\mu\text{m}$  de diámetro. El cinetoplasto se conforma por un pequeño blefaroplasto y un cuerpo basal oval.

2.- Epimastigote: Se encuentra en el intestino del insecto vector, son formas proliferativas, móviles y no se les considera infectivas. De forma alargada y fusiforme mide de 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud. El cinetoplasto y el flagelo se encuentran anteriores al núcleo, que se encuentra en el centro del cuerpo.

3.- Tripomastigotes: Miden aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de longitud y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Es alargado y fusiforme. Posee un núcleo grande cerca de la parte central y a lo largo de su cuerpo tiene una membrana ondulante bordeada por un flagelo, que se inicia en el cinetoplasto y sale por el extremo anterior, lo que le confiere gran movilidad. Los tripomastigotes pueden observarse en tejidos y sangre del hospedero vertebrado, y en el intestino posterior, heces y orina del insecto.



**Figura 1. Morfología de *T. cruzi*.** Los tres estadios de desarrollo del parásito se diferencian entre sí por la posición del cinetoplasto y por la presencia de la membrana ondulante.



### **Ciclo Biológico**

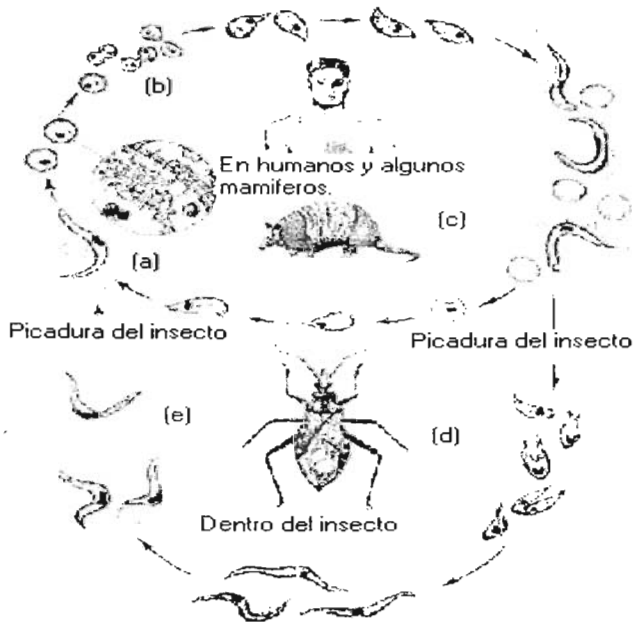
El ciclo biológico de *T. cruzi* comprende dos fases, por lo que se dice que tiene ciclo de vida bifásico; una fase entre hospederos vertebrados o mamíferos, en los cuales las infecciones son establecidas, y otra fase hospederos invertebrados que sirven como vectores para la transmisión.

El ciclo se inicia cuando los insectos de la familia *Reduviidae* como *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* y principalmente *Triatoma infestans*, se alimentan de sangre de mamíferos parasitados con las formas de tripomastigotes. En el estómago del insecto, los tripomastigotes se redondean formando amastigotes en la parte media del intestino en donde se transforman en epimastigotes que se replican repetidamente mediante fisión binaria y aproximadamente dos semanas después, llegan al recto, donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos los cuales son expulsados cuando el insecto defeca mientras se esta alimentando de sangre (Zeledon, 1997; Kolien y Schaub, 2000; García y Azambuja, 1991). El prurito producido por la picadura a menudo da como resultado una infección causada por rascado o frotamiento de la herida en la piel o mucosas cercanas, por donde el parásito entra al organismo. En los mamíferos, los tripanosomas no se multiplican mientras se encuentran en el torrente circulatorio pero una vez que penetran en las células de los tejidos, llevan a cabo el proceso de invasión-infección, debido a que los estadios de *T. cruzi* en el vertebrado, son parásitos obligados intracelulares capaces de invadir y replicarse dentro de una amplia variedad de células fagocíticas y no fagocíticas, una propiedad que asegura que el ciclo de vida se complete.

Cuando el tripomastigote metacíclico entra al hospedero vertebrado, invade a las células iniciando así el ciclo intracelular, el cual tarda un promedio de 4-5 días. Una vez dentro del citoplasma celular el parásito se diferencia a amastigote, el estadio intracelular replicativo. En un período de reposo de 20 horas, los amastigotes se dividen por fisión binaria con un tiempo de duplicación de 12 horas dando lugar hasta 500 parásitos generados por cada uno originalmente internado. Después del período replicativo, los amastigotes pasan a tripomastigotes, la célula hospedera se rompe y los parásitos son liberados al torrente sanguíneo e invaden otras células y continúan el ciclo en el hospedero vertebrado o podrían ser ingeridos nuevamente por el insecto vector. Estas formas son por lo tanto llamadas tripomastigotes sanguíneos, en el sentido que ellos pueden invadir células del vertebrado y repetir el ciclo intracelular. La forma infectiva conocida como amastigote lleva un subciclo alternativo el cual ocurre



cuando en el hospedero mamífero los amastigotes originados de la lisis prematura de células infectadas (Hudson y cols, 1984; Umezawa y cols, 1985) o por diferenciación extracelular de tripomastigotes invaden fagocitos, donde pueden sobrevivir y continuar con el ciclo de vida del parásito (Andrews y cols, 1987; Ley y cols, 1988; Moratara, 1991; Pan, 1978).



**Figura 2. Ciclo biológico de *T. cruzi*.** Este ciclo tiene dos fases una en el hospedero mamífero que comienza; con la picadura del insecto liberando parásitos que infectan células fagocíticas en donde los tripomastigotes se transforman en amastigotes (a), este último estadio se multiplica por fisión binaria dentro de la célula hospedera provocando su lisis liberando una gran cantidad de parásitos los cuales se diferencian a el estadio de tripomastigote (b), estos llegan a torrente sanguíneo e infectando nuevas células de diversos órganos (c). La otra fase del ciclo biológico se lleva a cabo en el insecto el cual ingiere tripomastigotes al picar al hospedero mamífero multiplicándose en el mesogastrio del insecto en forma de epimastigotes (d), posteriormente se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el recto de la chinche los cuales son inoculados en el hospedero mamífero cuando la chinche defeca sobre la piel durante la ingestión de sangre, los parásitos son autoinoculados al frotar las heces contaminadas del insecto en la herida causada por la picadura en la conjuntiva, en las mucosas o en escoriaciones de la piel (e).





### **Mecanismo de infección**

El mecanismo molecular mediante el cual el tripomastigote es reconocido e internado por las células hospederas aún no se ha logrado dilucidar. Originalmente se asumió que era un proceso parecido al de la fagocitosis muy similar al mecanismo de entrada de muchas bacterias patógenas, el cual moviliza el citoesqueleto de actina de la célula hospedera (Gruenheid y Finlay, 2003).

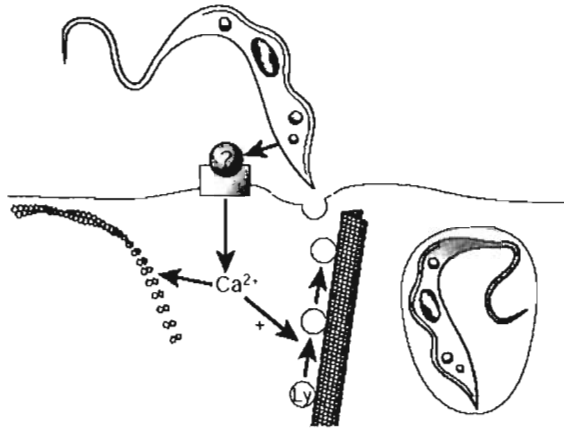
Sin embargo, existen reportes que muestran que el proceso de invasión es un evento complejo que parece involucrar diversas etapas, iniciando con la unión del parásito a la célula hospedera (Brener y cols, 1973). Se ha observado que durante la unión parásito-célula hospedera hay un reclutamiento de lisosomas, como un proceso consecuente de la interacción e invasión de la célula hospedera por *T. cruzi*, de esta forma se cree que el parásito activa algunas vías en la transducción de señales para inducir la movilización de lisosomas involucrándose en este proceso la participación de fosfolipasa C con formación de inositol trifosfato (IP3) y un incremento en la concentración de calcio intracelular (Rodríguez y cols, 1995; Schenckman y Mortara, 1992; Tardieux y cols, 1994).

Una vez llevados los lisosomas al sitio de unión del parásito, éstos se fusionan entre ellos y con la membrana plasmática para permitir la entrada del parásito a través de una vacuola que los transporta hacia la periferia nuclear de la célula. En este aspecto algunos estudios reportan que solo los lisosomas que se encuentran en la periferia del sitio de unión del parásito con la célula, son los que se reclutan para la internación del parásito (Rodríguez y cols, 1996; Burleigh y Andrews, 1995; Tardieux y cols, 1992).

Se ha observado que las concentraciones de calcio intracelular inducen la excitosis de los lisosomas, siendo modulados por niveles intracelulares de AMPc, indicando que el AMPc generado en la célula, es una respuesta a la interacción del tripomastigote con ésta y que tiene un papel en el proceso de reclutamiento y fusión con la membrana plasmática de los lisosomas (Rodríguez y cols, 1999).

Se ha observado un contacto frecuente entre los amastigotes y los microtúbulos en células infectadas con *T. cruzi* sugiriendo que el reclutamiento de los lisosomas es mediado por microtúbulos (Rodríguez, 1996; Carvalho y cols, 1999).





**Figura 3. Invasión de *T. cruzi*.** El parásito provoca un incremento en las concentraciones de calcio intracelular con la unión de un producto no identificado. Este flujo del calcio desestabiliza el citoesqueleto de actina e induce la organización de microtúbulos para mediar la fusión de lisosomas a la membrana plasmática. El *T. cruzi* usa esta membrana para

### **Participación del citoesqueleto de actina en el proceso de infección de *T. cruzi***

Poco se sabe de la participación del citoesqueleto de actina durante el proceso de infección de *T. cruzi*. Existen reportes que sugieren que dicho proceso es dependiente de actina mientras que otros reportan una insensibilidad del proceso en presencia de drogas que desorganizan actina sugiriendo que es un proceso independiente de microfilamentos. En 1991 Schenckman y colaboradores, realizaron ensayos de invasión con tripomastigotes en presencia de citocalacina D (droga que induce la despolimerización del citoesqueleto de actina), mostrando que no hubo una inhibición en la entrada del parásito en células HeLa y MDCK, mientras que la entrada de la bacteria intracelular *Salmonella* fue efectivamente inhibida. Un año después, muestran reportes en donde indican que a pesar de la presencia de citocalacina D (CD) se observa una tinción específica de F-actina con faloidina (que estabiliza los microfilamentos de actina) en los sitios de invasión del tripomastigote en células HeLa. Este fenómeno mostró estar acompañado por la extensión de pseudópodos alrededor de los parásitos, un proceso que ha sido denominado como *self zippering*, donde la mayor parte de la energía proviene del parásito. Los mismos autores no obtuvieron los



mismos resultados en fibroblastos 3T3 o células epiteliales MDCK sugiriendo que esto pudiera estar restringido a células HeLa (Schenkman y Mortara, 1992).

En 1992 Tardieux y colaboradores, al realizar infecciones en células MDCK polarizadas y tratarlas con CD mostró un aumento en la invasión sobre el dominio apical. Gottlieb y colaboradores, en 1993 demuestran que el tratamiento de células MDCK con CD, inhibe selectivamente la capacidad de las células para llevar a cabo endocitosis de marcadores en la superficie apical, sin afectar la endocitosis en el dominio basolateral, lo cual concuerda con los resultados de Schenkman y colaboradores, en 1988 en donde se presentan imágenes de microscopía electrónica de barrido en donde se aprecian tripomastigotes entrando a células epiteliales MDCK sin la formación de un pseudópodo o cualquier otra alteración de la membrana plasmática en la célula huésped, observando que son altamente resistentes a la infección apical cuando están polarizadas o confluentes, por lo que los tripomastigotes entran preferentemente a través de la superficie basolateral de la célula, sugiriendo que la entrada del parásito puede ser influenciada por la polaridad celular.

Barbosa y Mirelles en 1995, realizaron estudios ultraestructurales en macrófagos peritoneales de ratón y mostraron la movilización de componentes del citoesqueleto a la región de internación del parásito, la formación de la membrana "tipo mango" alrededor de los tripomastigotes la cual pudo ser resultado de rearrreglos focales de filamentos de actina en el sitio de entrada del parásito. Además, estos estudios también mostraron que los parásitos fueron incapaces de invadir células fijadas. Posteriormente, en 1999 Carvalho y colaboradores, hicieron observaciones usando FITC-faloidina en células Vero, mostrando que en las células analizadas, la polimerización de actina tomó lugar en los sitios de internación del parásito. También, en el 2002 Rosestolato y colaboradores, observaron que la incubación de células Vero, LLCMK 2, macrófagos y HFSF en presencia de CD presentan una marcada inhibición en la internación de tripomastigotes, a pesar de que se observó un marcado incremento en el número de parásitos unidos a la superficie celular, las imágenes obtenidas no indicaron que se llevara a cabo un proceso fagocítico típico en el sitio donde se encontraba el parásito, por lo que se sugiere que los parásitos también pudieran penetrar por otro proceso el cual no requiere concentración de filamentos de actina alrededor del parásito, mismas observaciones que fueron hechas por Carvalho y colaboradores, en 1999.

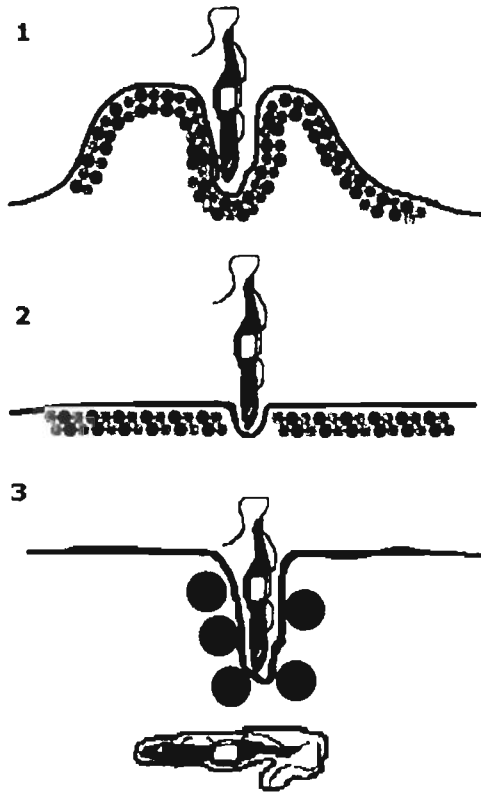


Recientemente en el 2004 Wooley y Burleigh, reportaron que la invasión de *Trypanosoma cruzi* de fagocitos no-profesionales se facilita por el proceso de despolimerización del citoesqueleto de actina de la célula huésped y que la entrada invasiva de tripomastigotes a la célula huésped es debido a que el parásito se aprovecha de un proceso de reparación del daño celular que involucra  $Ca^{2+}$  regulando la exocitosis de lisosomas (lisosoma-dependiente) o comprometiendo una vía lisosoma-independiente recientemente reconocida. Originalmente se había postulado que los microfilamentos de actina cortical presentan una barrera para la fusión de lisosomas a la membrana plasmática y la transiente despolimerización de actina permite el acceso a la membrana plasmática para la fusión de los lisosomas aumentando la entrada de *T. cruzi*. Al tratar células con citocalacina D se inhibe la asociación temprana de lisosomas con tripomastigotes de *T. cruzi* que al paso de la penetración celular desacoplan el empleo y/o fusión de lisosomas. Estos resultados muestran que la entrada de *T. cruzi* dependiente de lisosomas comienza por la invaginación de la membrana plasmática, algo similar se observó en la entrada independiente de lisosomas. Además, la ruptura prolongada de microfilamentos de la célula hospedera da como resultado la pérdida significativa de parásitos internalizados a las células hospederas infectadas. Así, la habilidad de tripomastigotes internalizados de permanecer asociado a la célula y fundir lisosomas de la célula hospedera es extremadamente dependiente del reensamble de los microfilamentos de actina, revelando un papel no previsto para la reconstrucción del citoesqueleto de actina en el proceso de invasión de *T. cruzi*.

Así, se han sugerido tres posibles mecanismos por el cual el *T. cruzi* infecta a la célula hospedera;

- 1) Un proceso fagocítico que involucra la formación de proyecciones tipo filopodios que dependen de la acumulación de filamentos de actina.
- 2) Un proceso endocítico que no depende de la formación de proyecciones tipo filopodios, pero que depende de la acumulación de filamentos de actina para internalizar al parásito.
- 3) Un proceso endocítico que no depende de los filamentos de actina (Fonseca, 2002). Si no, de la formación de una vacuola parasitófora, en donde ésta es lisada por enzimas posiblemente liberadas por el parásito (Carvalho y cols, 1989; Ley y cols, 1990).





**Figura 4. Mecanismos sugeridos para la entrada del *Trypanosoma cruzi* a la célula hospedera.** Se sugieren tres mecanismos en uno se involucra la participación de actina en la formación de estructuras tipo filopodios (1), también se sugiere que actina participa sin la formación de filopodios en un proceso endocítico (2) y el otro mecanismo sugiere un proceso independiente de actina con la formación de una vacuola parasitófora formada por la unión de lisosomas al sitio de entrada del parásito (3).

Es necesario realizar futuros estudios para dilucidar él o los mecanismos y determinar si más de uno de ellos se lleva a cabo de manera simultánea y si son usados de manera diferencial por los distintos estadios de desarrollo del parásito, etc.

### Citoesqueleto

El citoesqueleto es una estructura supramolecular o red tridimensional de filamentos que contribuye la integridad de la célula (Alberts y cols, 1993). Define la forma y arquitectura celular, permite el movimiento y transporte intracelular por medio



de proteínas motoras, media procesos de endocitosis y exocitosis, participa activamente en la mitosis y en los procesos de modulación de receptores de superficie (define la conformación y función de los receptores), crea compartimientos (favorece la organización funcional) y participa en los procesos de interacciones intercelulares.

El citoesqueleto está formado por tres tipos de estructuras bien definidas: los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios, cada una de estas estructuras posee proteínas características asociadas.

Cada estructura del citoesqueleto está formada por diferentes subunidades proteicas: la actina forma los filamentos de actina, varios tipos de miosina forman los filamentos de miosina, la tubulina forma los microtúbulos y una familia de proteínas fibrosas como la vimentina, la queratina así como la lámina nuclear forman los filamentos intermedios. La actina y la tubulina son altamente conservadas durante el curso de la evolución, por tanto se consideran como fundamentales en la estructuración del citoesqueleto. Estas proteínas filamentosas se unen a una gran variedad de proteínas accesorias y en conjunto, tienen participación en las distintas funciones que realiza la célula.

De los tres tipos de proteínas filamentosas que componen el citoesqueleto, solo la actina y los filamentos intermedios están asociados con las uniones célula-célula y con la matriz extracelular (Small y cols, 1999). Esta adhesión célula-célula es requerida para la morfogénesis de los tejidos y para mantener la homeostasis (Vasioukhin y Fuchs, 2001).

## **Citoesqueleto de Actina**

El citoesqueleto de actina es una red dinámica de polímeros de actina y gran variedad de proteínas asociadas. Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. También, participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares, es esencial para algunas actividades contráctiles y controla las interacciones celulares, la adhesión molecular y el transporte intracelular (Schmit y Hall, 1998).

La actina es una de las proteínas más abundantes en las células eucariotas, a menudo constituye del 5% al 10% de la proteína celular total, hasta el 20% en el músculo esquelético. La molécula de actina tiene un peso molecular de 41,736 kD y



cada molécula es un único polipéptido de 375 aminoácidos y esta asociada íntimamente con la molécula de ATP (Alexander y cols, 1992).

La actina existe como monómero globular, denominado G-actina y como polímero filamentosos, la F-actina, que es una cadena lineal de subunidades de actina G, que se observan como hebras de 6-8 nm de diámetro generado por hebras de proteínas globulares de 4 nm de diámetro, enrolladas en doble hélice dextrógira (13.5 moléculas de actina por vuelta); también se le denomina actina polimerizada. La disgregación de F-actina mediante soluciones salinas muy diluidas da lugar a las subunidades globulares o G-actina. Su estructura tridimensional se conoció mediante la cristalografía de rayos X; destaca la existencia de dos dominios plegados y separados por un profundo surco, cada dominio tiene dos subdominios. El surco es el lugar en donde se une el ATP. Aproximadamente el 50% de la actina existente en una célula se encuentra bajo la forma G. La G-actina va siempre asociada a diferentes proteínas que impiden su polimerización.

Cada molécula de actina contiene  $Mg^{2+}$ , que forma un complejo con ATP o ADP. En consecuencia, hay cuatro estados de actina: ATP-actina G, ADP-actina G, ATP-actina F y ADP-actina F, de las cuales dos predominan en la célula, ATP-actina G y ADP-actina F.

Al igual que los microtúbulos, un filamento de actina es una estructura polar, con dos extremos estructuralmente distintos, un extremo menos (-) estructuralmente inerte y de crecimiento lento y un extremo más (+) de crecimiento rápido, la actina en este extremo polimeriza unas 10 veces más rápidamente que el extremo (-). La incorporación de G-actina o actina globular se lleva a cabo en los dos extremos del filamento, la parte (-) y la parte (+), para darle forma de hélice a los filamentos de actina o F-actina. Rápidamente después de la polimerización, el fosfato terminal del ATP unido a la molécula de actina se hidroliza, quedando un ADP atrapado entre los dos monómeros, formando así el polímero en forma de hélice (Alberts y cols, 1993).

La actina al participar en varios procesos celulares, requiere de un comportamiento dinámico, el cual involucra la polimerización y despolimerización de los filamentos, este proceso requiere de la participación de la forma soluble o globular para formar los filamentos y viceversa (Ballestrem y cols, 1998). La presencia de iones  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  o  $Na^+$ , inducen la polimerización de G-actina y el proceso es reversible si disminuye la fuerza iónica.



En las células, los filamentos de actina pueden formar estructuras estables y estructuras lábiles. Los microfilamentos estables forman el eje de las microvellosidades orientados verticalmente en la parte apical de los epitelios, unidos entre sí por proteínas como la fimbrina y la vellosina. Son un componente esencial en el aparato contráctil de las células musculares en donde forman el sarcómero que está altamente organizado y es muy estable. En células no musculares los filamentos de actina se encuentran a lo largo de la membrana basolateral formando parte de lo que se conoce como la red cortical que forma parte fundamental en la adhesión célula-célula y a diferentes sustratos en el caso de cultivos celulares. Muchos de los movimientos celulares dependen de estructuras lábiles formadas por microfilamentos de actina.

### **Isoformas de Actina**

En los mamíferos existen 6 isoformas de actina o isoactinas estructuralmente relacionadas, clasificadas según su patrón de expresión en 4 actinas musculares ( $\alpha$ -esquelética,  $\alpha$ -cardiaca,  $\alpha$ -vascular y  $\gamma$ -entérica) y 2 actinas no musculares o actinas citoplasmáticas ( $\beta$ -actina y  $\gamma$ -actina) (Dodemont, 1982). Sin embargo, todas las células de organismos superiores tienen isoformas codificadas por una familia de genes de actina, se agrupan en tres clases, dependiendo de su punto isoeléctrico ( $\alpha$ -actina,  $\beta$ -actina y  $\gamma$ -actina). Aunque las distintas formas de actina presentan diferencias sutiles en sus propiedades, las secuencias de aminoácidos han sido altamente conservadas a lo largo de la evolución. Las isoformas de actina difieren unas de otras por unos cuantos aminoácidos, donde la heterogeneidad en la secuencia codificante varía predominantemente en el extremo amino de las isoactinas, así por ejemplo, el extremo amino terminal de  $\alpha$ -actina del músculo esquelético contiene la secuencia Asp-Glu-Asp-Glu, mientras que los segmentos correspondientes para  $\beta$  y  $\gamma$  actina son Asp-Asp-Asp y Glu-Glu-Glu respectivamente (Vandekerckhove y Weber, 1978).

La  $\beta$  actina es la principal isoforma de las actinas citoplasmáticas y está expresada en la mayoría de las células eucarióticas no musculares, así como en mioblastos indiferenciados (Nudel, 1983). Las actinas musculares son tejido específicas y están funcionalmente involucradas en la contracción muscular. En cambio, las actinas citoplasmáticas están expresadas en todos los tipos celulares y participan en una gran variedad de funciones (Small, 1998). La distinción entre actinas musculares y no musculares aparece en animales superiores, aunque es observada en vertebrados e insectos. En los vertebrados de sangre caliente la isoforma  $\beta$  es regulada negativamente y sustituida por las isoformas musculares específicas durante el proceso





de biogénesis (Hayward, 1986). Las isoformas de actina no solo se expresan diferencialmente en los distintos tipos celulares, también pueden coexistir dentro de la misma célula y segregarse a diferentes regiones (Mounier, 1997).

El gen funcional humano de la  $\beta$ -actina (ACTB) ha sido mapeado en el cromosoma 7p22 (Nayama, 1996). Está formado por 5 intrones y 6 exones, 4 de los intrones se hallan interrumpiendo la región codificante entre los codones: 41/42, 121/122, 267 y 327/328. En la región no transcrita 3' no aparecen intrones en humano; sin embargo, la región no transcrita 5' presenta un largo intrón (intrón I), 6 nucleótidos arriba del codón de iniciación. Las posiciones relativas de las secuencias correspondientes a las cajas TATA y CCAAT corresponden con secuencias similares de otros genes (Quitschke, 1998).

En estudios de la expresión de los genes de  $\gamma$  y  $\beta$ -actina realizados en diferentes especies de mamíferos, se ha encontrado que ambos mensajeros poseen una longitud de 2,100 pb, correspondiendo 1,100 a las regiones codificantes. Asimismo, existe una elevada conservación interespecie de la longitud de las regiones no codificantes, que no excluye la posibilidad de secuencias divergentes (Harris, 1992). En el humano, el ARNm de la  $\beta$ -actina tiene una longitud en la región codificante de 1,761 pb, 41 pb en la región 5' UTR y 595 pb en la región 3' UTR. Esta última está flanqueada por una cola de poli A de 50 pb aproximadamente (Ponte, 1984). Los ARNm de ambas actinas citoplasmáticas se hallan segregados dentro de la misma célula y, aunque existe coexpresión, está sujeta a regulación diferencial e independiente para cada isoforma en los diferentes tipos celulares (Hill y Gunning, 1993).

Se ha demostrado que el ARNm de la  $\beta$ -actina se localiza en las regiones periféricas móviles y la región perinuclear, mientras que el ARNm de la  $\gamma$ -actina solo se asocia con la región perinuclear, lo que implicaría una señal de localización que es única para la isoforma  $\beta$  y podría reflejar procesos relacionados con la motilidad celular (Hoock y cols, 1991).

En muchas células, a pesar de sus diferentes orígenes y diferencias morfológicas,  $\beta$  y  $\gamma$ -actina coexisten en una proporción constante de aproximadamente 2:1 y al parecer, las células mantienen esta proporción de las dos isoformas, incluso si la síntesis de una de ellas es reducida debido a la expresión de un gen de  $\beta$ -actina mutante exógena (Leavitt y cols, 1987).



Por otro lado, se sugiere que existen pozas de filamentos conteniendo diferentes isoformas de actina separados en compartimentos dentro de la misma célula, (Yao y cols, 1995), se ha demostrado que la membrana canalicular apical en células parietales está asociada con filamentos de actina que contienen  $\beta$ -actina, mientras que las membranas basolaterales contienen  $\gamma$ -actina. Además, en otros estudios realizados con células del músculo liso vascular y pericitos (parecidos a miocitos cardiacos y esqueléticos) tratados con anticuerpos específicos contra cada una de las isoformas de actina, se observó que las proyecciones móviles se forman principalmente de  $\alpha$ -actina vascular, mientras que  $\gamma$ -actina no muscular se localiza en el córtex celular y  $\beta$ -actina está distribuida preferencialmente en las estructuras lamelares, donde se produce el plegamiento de las membranas (*ruffling*) y en los pseudópodos de avance. La separación de estas pozas de filamentos en la célula, podría sugerir la existencia de una distribución polarizada de las proteínas de unión y su interacción con isoformas de actina específicas (Yao y cols, 1995).

Muy poco se conoce acerca de las diferencias funcionales entre las isoformas de actina, incluso, se desconoce casi por completo si las diferencias en la estructura de las isoformas de actina determinan qué proteínas se unen a ellas. Sin embargo, se cree que el hecho de que existan distintas isoformas que se encuentran en compartimentos distintos, que son altamente conservadas y presenten una expresión diferencial en una misma célula, es debido a que cada una de las isoactinas son funcionalmente especializadas para los tejidos en los cuales predominan (Rubenstein y Spudich, 1977).

## Proteínas asociadas a actina

Reciben el nombre genérico de proteínas de unión a actina o ABPs (*Actin Binding Proteins*), son bastante numerosas y llevan a cabo funciones muy diversas. La actina liga colectivamente un gran número de estas proteínas ABPs. Pollard y Cooper en 1976, identificaron un número grande de ABPs y recientemente se contaban 162 proteínas distintas y separadas sin incluir sus tantos sinónimos o isoformas, por lo que no hay duda de que se identificarán más. Muchas de las uniones de ABPs se llevan a cabo en la misma superficie de la actina, por lo que puede esperarse que compitan entre ellas. Algunas unen con la polaridad positiva y tienden a formar los complejos ternarios pero unen más con la polaridad negativa. Por lo menos en miofibrillas ocho proteínas del sarcómero ligan a los filamentos delgados. Al menos 12 ABPs son proteínas asociadas a membrana, y otras nueve son receptores de membrana o transportadores de iones. Trece ABPs cruzan los filamentos de actina, considerando



que otras permiten a los filamentos actuar recíprocamente con otros elementos del citoesqueleto. Los microfilamentos probablemente no interactúan directamente con los microtúbulos y/o filamentos intermedios, pero lo hacen por medio de las proteínas. Actina también une otros 30 ligandos, incluso drogas y toxinas. Así el puro número de ligandos que tiene una afinidad significativa por actina sugiere que probablemente hay un gran número de sitios a ligar que cubren mucha de la superficie expuesta de la molécula (Dos Remedios y cols, 2003).

Intentar clasificar estos ABPs deja muchas proteínas "huérfanas" que no encajan en las familias, y cualquier esfuerzo por agruparlas podría ser algo arbitrario. Las clasificaciones según la función de las ABPs o su secuencia general también pueden ser problemáticas. Varios tipos de ABPs facilitan la polimerización y la despolimerización de actina. La clasificación de estos ABPs puede reducirse a siete grupos (Dos Remedios y cols, 2003):

- 1) Las proteínas de unión que secuestran monómeros de G-actina y previenen su polimerización por ejemplo, Timosina  $\beta$ 4, DNAsa I.
- 2) Las proteínas que despolimerizan filamentos e inducen la conversión de F- a G-actina, ejemplo CapZ y cofilina.
- 3) Las proteínas que cubren los extremos de los filamentos de actina con el fin de prevenir el intercambio de monómeros en el extremo (-) o puntiagudo, por ejemplo, tropomodulina o en el extremo (+) o barbado, por ejemplo, CapZ.
- 4) Las proteínas que desunen al filamento y acortan la longitud media de los filamentos al ligarse a un lado de la F-actina y lo cortan en dos pedazos, por ejemplo, gelsolina.
- 5) Las proteínas que contienen por lo menos dos sitios de unión para F-actina, facilitando así, la formación de haces de filamentos, ramificaciones y redes tridimensionales, por ejemplo, Arp2/3.
- 6) Las proteínas estabilizadoras unidas a los lados de los filamentos de actina y previenen la despolimerización, por ejemplo, tropomiosina.
- 7) Proteínas motoras que usan F-actina como una pista en la cual se mueven, por ejemplo, la familia del motor de miosina.



Las proteínas que a continuación se describen brevemente se eligieron porque 1) representan a una familia de proteínas relacionadas, 2) son extensamente distribuidas en la naturaleza, 3) hay una estructura atómica disponible para cada una de ellas (o por lo menos un modelo creíble) y 4) cada una se expresa en cantidades significativas en las células.

### **Timosina $\beta$ 4**

Las timosinas son una familia de proteínas no motoras de bajo peso molecular, alrededor de 5kD, son una familia de proteínas altamente conservadas, aisladas de la glándula del timo, son abundantes en el tejido neural así como en células circulantes tales como plaquetas, leucocitos y macrófagos, sin embargo, sus niveles traduccionales varían de tejido a tejido; están constituidas por 43 residuos de aminoácidos, de los cuales, solo un pequeño grupo de ellos, se unen a la región amino terminal de actina, compitiendo con DNAsa I por este sitio, un miembro de esta familia es la timosina  $\beta$ 4 ( $t\beta$ 4). El extremo carboxilo de  $t\beta$ 4 hace contacto con actina en la His-40 cerca de la hendidura de unión a ATP generando cambios conformacionales en esa región de los monómeros de actina evitando la unión de ATP, de esta manera,  $t\beta$ 4 refleja su habilidad para secuestrar a los monómeros de actina e inhibir la polimerización (De la Cruz y cols, 2000).

### **DNAsa I**

La desoxirribonucleasa I es una glicoproteína con una actividad de endonucleasa que rompe al ADN de doble cadena para producir polinucleótidos fosforilados en el extremo 5'. No es una enzima específica pues no reconoce ni bases específicas ni secuencias específicas de ADN. DNAsa I forma un complejo 1:1 con la G-actina previniendo la formación de filamentos de actina, por otra parte, la actina determina la inhibición de la DNAsa. También puede unirse a F-actina donde actúa como una proteína encapuchadora que aumenta la velocidad de disociación de los monómeros de los extremos (-) de los filamentos. La importancia biológica de esta unión aún es desconocida pero se ha aprovechado para purificar actina y estudiar la polimerización del filamento. (Dos Remedios y cols, 2003).

### **Profilina**

La profilina es la proteína de unión a actina más pequeña que se ha identificado en todas las células eucariotas investigadas hasta ahora. Varios organismos, expresan



más de un isoforma de profilina. Se ha demostrado la importancia de profilina para la proliferación celular en los estudios genéticos: la delección del gen de profilina es letal o modificando el crecimiento y motilidad de los organismos (Schluter y cols, 1997). Profilina actúa directamente sobre actina, fosfolípidos ácidos y varias proteínas que contienen poliprolina. Se une a los monómeros de actina con una estequiometría compleja de 1:1 con una afinidad micromolar, prefiriendo la unión actina-ATP a la de actina-ADP. Profilina puede afectar la dinámica de actina de varias maneras. En la ausencia de un filamento libre en el extremo (+), la profilina funciona como una proteína que secuestra al monómero de actina, porque el complejo profilina-G-actina no participa en la polimerización del extremo (-) (Dos Remedios y cols, 2003).

### **Cofilina**

La familia de ADF/Cofilina tiene proteínas relativamente pequeñas (15-19kD) de múltiples isoformas (Lappalainen y cols, 1998). Esta familia tiene altos niveles de expresión en tejidos hematopoyéticos, osteoclastos y fibroblastos. En células quiascentes, se encuentra distribuida en el citoplasma, mientras que en células activas se trasloca a las regiones corticales donde el citoesqueleto de actina es altamente dinámico y dirige el plegamiento de las membranas. Sus principales funciones incluyen el rápido reciclamiento de los monómeros de actina asociado con el plegamiento de la membrana (*ruffling*) y con la citocinesis (Hawkins y cols, 1993). Debido a que presenta una mayor afinidad por los complejos actina-ADP que por actina-ATP, no solamente promueve el desensamblaje de los monómeros de actina-ADP de los filamentos, sino que también puede unirse a los monómeros de actina-ADP liberados e inhibir el intercambio de ADP por ATP (Maciver y Weeds, 1994; Carlier y Pantaloni, 1997; Blanchoin y Pollard, 1998; Blanchoin y Pollard, 1999).

### **CapZ**

CapZ es una proteína de encapuchamiento que está presente en todas las células eucariotas. Es un heterodímero que comprende una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , requeridas para cubrir efectivamente los extremos (+) de los filamentos. Los papeles biológicos reportados para esta proteína incluyen su participación en la nucleación del ensamble de actina, captura de los filamentos preexistentes, regulación del ensamble de actina en el extremo (+) de los filamentos, modula la polimerización-despolimerización del filamento e incluso promueve la formación de nuevos filamentos,



la eliminación del alineamiento en el extremo (+) y el correcto ensamble de los filamentos en el disco Z del músculo esquelético (Dos Remedios y cols, 2003).

### **Tropomodulina**

La tropomodulina es una de las pocas proteínas que se unen al extremo (-) de los filamentos de actina, inhibiendo su elongación. A pesar de que tropomodulina se une a los filamentos de actina, su afinidad es débil comparada con su afinidad por los filamentos de actina decorados con tropomiosina. Existen modelos propuestos para la estructura de tropomodulina, en los que se sugiere que la mitad del extremo amino terminal de tropomodulina se une al extremo amino de tropomiosina, produciendo un cambio conformacional que resalta el extremo carboxi terminal de algún monómero de actina localizado en el extremo (-) de un filamento y que accede a que la tropomodulina sufra un ligero doblamiento hacia la subunidad de actina que permite cubrir el extremo (-) del filamento, evitando así la asociación de otros monómeros de actina y aumentar el tamaño del filamento (Dos Remedios y cols, 2003).

### **Gelsolina**

Gelsolina pertenece a una superfamilia de proteínas de unión a actina expresadas en todas las células eucariotas. Gelsolina es una proteína de fragmentación, por tanto reduce el tamaño del filamento y afecta considerablemente a la viscosidad del citoplasma ya que corta y encapucha filamentos de actina. Esta proteína consiste de dos mitades homólogas en tándem cada una conteniendo tres pliegues repetidos. Su extremo amino terminal puede unirse a dos monómeros de actina y puede romper los filamentos, un evento que es dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ . Mediante datos cristalográficos, Robinson y colaboradores, en el 2004 concluyeron que el  $\text{Ca}^{+2}$  unido a gelsolina induce un rearrreglo conformacional que le permite interactuar con el sitio de unión a actina, habilitándolo para cubrir y separar a los filamentos. La separación de los filamentos de actina ocurre solamente cuando se han disociado suficientes uniones actina-actina a lo largo del filamento (Dos Remedios y cols, 2003).

### **Arp2/3**

Las proteínas Arp2 y Arp3 son estructuralmente similares al monómero de actina y para llevar a cabo su actividad se requiere que se ensamblen entre ellas para formar un complejo conocido como Arp2/3. Este complejo se encuentra asociado con regiones corticales dinámicas de células de animales que son ricas en actina. Se



localiza específicamente en los puntos de ramificación de la red de filamentos corticales, de aquí que la principal función del complejo Arp2/3 sea la de crear puntos de ramificación mediante el ensamblaje de filamentos de actina cerca de los pliegues de las membranas. El proceso se inicia cuando el complejo Arp2/3 sufre un cambio conformacional que le permite llevar a cabo la nucleación de los filamentos de actina y ensamblar un filamento "hija" en un ángulo de aproximadamente 70° a través de su extremo (-) a un filamento "madre", dejando libre el extremo (+) para la elongación del filamento y generando redes de filamentos de actina (Dos Remedios y cols, 2003).

### **$\alpha$ -actinina**

Proteína estructural formadora de haces que interviene en la unión de los filamentos de actina en haces en lo que los filamentos quedan paralelos entre sí. Sus uniones con la actina dejan espacios que permiten la unión con la miosina. Este tipo de relación esta presente en las fibras de estrés. En su función de anclaje entre filamentos de actina actúa como un dímero. (Fernández y cols, 2000)

### **Fimbrina**

Es otra proteína estructural que interviene en la formación de haces, uniendo los filamentos paralelos entre sí de manera tal que no permitan la unión con otras moléculas, el empaquetamiento es mucho más estrecho que en el caso de la anterior proteína. Se ha descrito su presencia en los filopodios, microvellosidades y microespinas. Su función de anclaje de los filamentos la realiza como monómero.

### **Miosina**

La miosina es una proteína motora, es una molécula alargada de un peso molecular aproximado de 450 kD que permite el deslizamiento de los microfilamentos de actina unos sobre otros. Se encuentra en casi todos los tipos celulares de los vertebrados, especialmente en tejidos musculares donde cada molécula de miosina consta de seis cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas (compuestas por una cabeza globular unida a una cola fibrosa) y dos pares de cadenas ligeras. El resto de la cadena pesada es una  $\alpha$ -hélice que se enrolla helicoidalmente con la otra cadena pesada. La cabeza globular de la miosina se une a los filamentos de actina para convertir la energía de la hidrólisis de ATP en fuerza mecánica y movimiento (Dos Remedios y cols, 2003). La digestión proteolítica de la molécula de miosina genera la meromiosina ligera (MML) y la meromiosina pesada (MMP). Los lugares susceptibles de



corte por proteasa funcionan como auténticas bisagras implicadas en las funciones motoras de la miosina, este tipo de miosina fue la primera conocida y se llamó miosina II. En 1973 se describió la miosina I, solo tiene una cabeza, su dominio de cola es más corto y muy variable y puede llevar asociadas una o más cadenas ligeras. En general, la cola es responsable de la unión espontánea de moléculas de miosina en filamentos más gruesos y las cabezas son responsables del desplazamiento de moléculas a lo largo de los filamentos adyacentes de actina. La miosina II está implicada en fenómenos de contracción muscular y en el proceso de citocinesis. La miosina I lo está en fenómenos de locomoción celular, fagocitosis y movimiento de organelos.

### **Tropomiosina**

La tropomiosina es una proteína accesoria asociada a actina en forma de varilla, de 41 nm de longitud, compuesta por un homodímero de cadenas  $\alpha$ -helicoidales que se enrollan una sobre la otra. La tropomiosina se une al filamento de actina endureciéndolo y estabilizándolo, asociándose a siete monómeros debido a que contiene siete regiones de secuencias homólogas, espaciadas regularmente y cada una de estas secuencias se une a un monómero de actina. Junto con la troponina media el control que el  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce sobre la contracción muscular. La unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a la troponina modifica la posición de la tropomiosina en el filamento de actina permitiendo la unión actina-miosina. La tropomiosina se localiza principalmente en lo profundo del cortex del sitio de ensamblaje activo de actina y su presencia posiblemente inhibe la unión de cofilina (Dos Remedios y cols, 2003).

### **Línea Celular MDCK**

Las células MDCK, pertenecen a una línea celular derivada de la porción ascendente gruesa del asa de Henle y de los túbulos distal y colector cortical del riñón de una perra cocker. Esta línea fue obtenida en 1953 por Madin y Darby. La característica principal de esta línea celular es que puede formar *in vitro* monocapas celulares que funcionan como epitelio de transporte.

En estado adulto este tipo de epitelio se encuentra recubriendo cavidades y se encuentra involucrado en el movimiento vectorial de iones, agua y macromoléculas, dicho movimiento incluye procesos como la absorción, secreción e intercambio de iones y diversos tipos de moléculas. Para llevar a cabo dichos procesos, primero se requiere de la organización del citoesqueleto para mantener la adhesión célula-célula y





la adhesión de la célula al sustrato que en los tejidos esta representado por la matriz extracelular; segundo, la diferenciación de la membrana celular en dos dominios estructural y funcionalmente diferentes denominados apical y basolateral. Cada dominio esta compuesto por diferentes grupos de proteínas, las cuales regulan el transporte de iones y solutos a través del epitelio (Yeman y cols, 1999).

En estas monocapas se forman complejos proteicos para integrar uniones intercelulares, como el de las uniones estrechas (UE), responsables del mantenimiento de la permeabilidad paracelular al paso de iones, a pequeñas moléculas y responsable del mantenimiento de la función de barrera epitelial que impide el paso de macromoléculas y microorganismos patógenos por la ruta paracelular.

Las células MDCK *in vitro*, forman un epitelio de transporte tanto transcelular como paracelular. El transporte transcelular consiste en el movimiento de iones y agua a través de la membrana del dominio apical y basolateral y es dependiente de ATP. El transporte paracelular es pasivo y se lleva a cabo entre las uniones de las células, por lo que dichas uniones forman una barrera. Las uniones herméticas, son las que determinan y regulan la permeabilidad del transporte paracelular. La permeabilidad es comúnmente evaluada por medio de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) (Ledezma, 2001).

En las células MDCK el citoesqueleto está organizado de forma semejante al citoesqueleto de los epitelios presentes en otros organismos. Está constituido por microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina, los cuales participan en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad, las interacciones célula-célula a través de los complejos de unión intercelulares, en las interacciones célula-sustrato, en la forma celular y en la función del transporte epitelial.

En las células MDCK, la organización de los microtúbulos es diferente en las células no polarizadas respecto a las de las células polarizadas. En las primeras los microtúbulos emergen con sus extremos negativos desde la región perinuclear y se extienden de forma uniforme en el citoplasma de la célula con sus extremos positivos hacia la periferia celular. Después del establecimiento de los contactos célula-célula y célula-sustrato, la red de microtúbulos se reorganizan formando un conjunto de microtúbulos cortos que se encuentran densamente distribuidos en el citoplasma de la región subapical y a lo largo de la membrana basal. También hay haces de microtúbulos largos distribuidos paralelamente a la membrana lateral y con sus



extremos negativos orientados hacia la región apical (Bacallao y cols, 1989). Esta organización de los microtúbulos se requiere para mantener a los organelos tales como el aparato de Golgi y el trans-Golgi y en la formación de vesículas que son fundamentales en la distribución de proteínas hacia los diferentes dominios de la membrana en las células (Yeman y cols, 1999). El tráfico de vesículas y organelos a través de los microtúbulos se lleva a cabo por proteínas motoras (específicas de microtúbulos) como la kinesina y dineína, que se mueven en el microtúbulo hacia el extremo positivo y negativo respectivamente (Bloom y cols, 1998)

En las células MDCK los filamentos intermedios se han observado alrededor del núcleo extendiéndose en el citoplasma hacia la periferia y conectándose a los desmosomas y hemidesmosomas (Leiser y cols, 1993). Se ha determinado que los filamentos intermedios participan en el mantenimiento de la morfología celular y que su grado de fosforilación varía durante la biogénesis de la monocapa (Benítez-King y cols, 1989).

Los microfilamentos de actina se encuentran formando parte de diferentes estructuras en las células MDCK. El citoesqueleto submembranal compuesto por los microfilamentos de actina y sus proteínas asociadas, que forman las fibras de tensión y que intervienen en la interacción célula-substrato, los que están presentes en el anillo circunferencial al nivel de la zona adherente (*zonula adherens*) por debajo de las UE y los de la unión estrecha que regulan la permeabilidad paracelular. Además, la actina se encuentra formando parte de las pequeñas microvellosidades apicales presentes en estas células, donde los haces están distribuidos verticalmente y unidos por miosina I, tropomiosina, fimbrina, villina y vellosina. La interacción que se establece entre la actina y sus proteínas asociadas determinan la formación de los paquetes de haces de actina presentes en las microvellosidades que son diferentes en su morfología con lo que se encuentran formando redes en el citoplasma. La actina también se encuentra distribuida a lo largo de la membrana por debajo de las microvellosidades y en la membrana basolateral formando parte de lo que se conoce como red cortical (Montes de Oca y cols, 1997).

Además de contribuir en la forma de las células, los microfilamentos de actina se encuentran involucrados en el transporte intracelular de vesículas que es llevado a cabo por las miosinas (Leiser y cols, 1993). El citoesqueleto de estas células es rígido y bien estructurado en comparación con el de otras líneas celulares epiteliales. Esta característica ha sido utilizada convenientemente para estudiar los cambios que tienen



lugar en la permeabilidad regulada por el citoesqueleto y ha sido un modelo útil para estudiar cambios en los epitelios durante la invasión por algunos microorganismos patógenos.

## **Transfección de células eucariotas**

Se le denomina transfección a la transferencia de material genético exógeno a una célula eucariota receptora. La transfección es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para la manipulación de células en cultivo que requieren la introducción de moléculas en el interior de las mismas, bien sea para observar el efecto que produce la molécula en sí por ejemplo una droga inhibidora de las proteasas citosólicas o para producir la síntesis de otras moléculas por ejemplo la introducción de un plásmido en el que se ha colocado bajo el control de un promotor que funciona en la célula de elección una secuencia codificante para la proteína buscada (Lewin, 2001).

La transfección ADN da lugar a líneas tanto estables como inestables, predominando relativamente las primeras. Los transfectantes inestables (llamado en ocasiones transfectantes transitorios) reflejan la supervivencia del ADN transfectado en forma extracromosómica; las líneas estables son el resultado de la integración en el genoma. En ambos casos se puede expresar el ADN transfectado (Lewin, 2001).

El objetivo fundamental de la transfección es que el ADN exógeno se mantenga en el sistema celular receptor, lo cual implica que conserve su integridad, es decir que no sea degradado por enzimas celulares y que de lugar a copias que alcancen a todas las células del cultivo, que replique y se propague adecuadamente. Un segundo objetivo de esta metodología es la expresión de la información que contiene el ADN transfectado. La célula receptora producirá los productos codificados en el ADN exógeno que pueden ser valiosos en sí mismos o pueden ser la causa de comportamientos especiales en la célula receptora.

El éxito de los métodos de transfección depende básicamente de las relaciones que se establezcan entre la célula receptora y el vector usado y su transfección ya que marcan el desarrollo de los procesos posteriores, tanto del mantenimiento estable del recombinante en el cultivo, como su posible expresión. Así, esta metodología se desarrolla alrededor de dos elementos principales que son los protagonistas del proceso de transfección y que son:



- ❶ El *ADN recombinante*, que resulta de la unión *in vitro* de un ADN donante exógeno y el ADN vector. Esta molécula es el objeto central de las etapas de trabajo *in vitro*, previas y posteriores a la transfección. Es preparado e introducido en el interior de bacterias y, luego, tras su aislamiento del cultivo, será purificado y analizado.
- ❷ La *célula receptora*, que recibirá el ADN recombinante para su mantenimiento, amplificación y expresión. Ofrece todos sus sistemas genéticos y bioquímicos y actúa como un laboratorio especializado donde se puede llevar a cabo la realización del proceso previamente diseñado.

Además, destacan dos etapas particulares dentro de la experimentación general de la transfección:

- ❶ La *transformación celular*: proceso en el que un ADN manipulado *in vitro* es transferido al interior de las células hospedadoras, atravesando la estructura de su membrana sin afectarla sustancialmente.
- ❷ El *análisis de clones transfectados*: que permite distinguir, entre las células que resultan del intento de transfección, aquellas que no hayan aceptado ADN exógeno, aquellas que solo hayan incorporado solo al ADN vector, aquellas que captaron moléculas de ADN recombinante y, finalmente, aquella colonia que incorporó una secuencia particular de ADN exógeno.

Todos estos elementos y etapas, acompañados de muchos otros factores y procesos previos, laterales, posteriores o complementarios, conforman una metodología compleja, rica en objetivos, procedimientos y aplicaciones. (Perera y cols, 2002).

### **Características del ADN exógeno o inserto**

El experimento suele ir dirigido al aislamiento, amplificación, análisis o expresión de un cierto fragmento de ADN que aparece como el objeto central de la transfección. En ocasiones se utiliza como soporte de una información para la síntesis de un producto proteico. La amplia metodología actual permite incorporar a este esquema cualquier tipo de ADN como inserto de transfección, así:

- ★ Puede ser un único fragmento o una población mixta de piezas diferentes de ADN



- ★ Puede ser un ADN bicatenario, un ADN de hebra simple o un ARN
- ★ Puede ser un ADN natural, extraído de una fuente biológica cualquiera, o bien una molécula sintética, obtenida artificialmente; también puede ser un ADNc sintetizado a partir de un ARNm (Perera y cols, 2002).

### **Características del ADN vector**

Es el principal responsable del éxito al depender de él tanto la supervivencia del recombinante en el cultivo transformado como la expresión del inserto en sus células. El ADN vector transporta distintos tipos de marcadores fenotípicos para la selección de células así como diversas señales para la expresión del inserto.

Es en este elemento en donde se pone en práctica toda la faceta de diseño que requiere un experimento de este tipo, los distintos vectores actualmente en uso se han conseguido tras un complejo proceso de desarrollo basado en un profundo trabajo de síntesis y modificación *in vitro*, buscando la creación de moléculas codificadoras de todas las funciones y portadoras de todas las señales necesarias para alcanzar los objetivos perseguidos. Los vectores son por ello construcciones complejas, moléculas quiméricas formadas a partir de la unión de regiones de muy diferentes procedencias, naturales o sintéticas, y colocadas en un orden y un sentido específico.

En muchos casos, un vector es específico para un determinado tipo de célula, en otros, el vector es activo en tipos celulares no muy diferentes, así existen vectores para la transferencia de ADN:

- ★ En diferentes especies bacterianas (transformación)
- ★ En diversas levaduras (transfección)
- ★ En gran número de plantas (transfección)
- ★ En distintos tipos de células o en embriones animales (transfección)
- ★ Existen vectores mixtos (polivalentes), construidos para que actúen en más de un tipo de célula (por ejemplo en bacterias y en células animales), se les conoce como vectores lanzadera.

Aunque el vector de ADN suele estar compuesto por piezas de muy distinta procedencia, es posible clasificar estos vectores en función a la fuente principal de la que deriva la señal que controla la replicación, como:



- ★ Derivados de plásmidos bacterianos o de levaduras
- ★ Derivados de bacteriófagos o de virus eucariotas
- ★ Vectores de origen mixto (cósmidos), derivados de más de un tipo de fuente (con más de un origen de replicación)
- ★ Vectores integrativos, cuya forma de actuar se basa en la integración del recombinante en el cromosoma de la célula receptora.

Finalmente, deben distinguirse dos tipos de vectores según las necesidades que se requieran obtener del inserto que transportan:

- ★ Vectores de transfección, cuya única misión es mantener establemente al recombinante en el interior de la célula receptora
- ★ Vectores de expresión, que aportan las señales necesarias para la transcripción y la traducción de la secuencia del inserto.

Para que una molécula de ADN pueda actuar como vector en un experimento debe de cumplir algunos requisitos mínimos:

- ★ Debe de contener un origen de replicación (región *Ori*), que sea activo en la célula receptora, capaz de dirigir la acción de la maquinaria replicativa celular sobre el recombinante y provocar su replicación, de manera que sus copias se repartan entre las células descendientes de aquella y se consiga así la amplificación del ADN transfectado. La naturaleza del *Ori* es fundamental para definir el rango de receptores de un vector, ya que esa región tiene que ser reconocida por el complejo replicativo celular.
- ★ En el caso de que el número de copias del recombinante en la célula no sea muy alto, es muy conveniente que el vector disponga de regiones que faciliten un buen reparto entre células hijas.
- ★ Debe presentar uno o, mejor, varios sitios únicos de restricción, de manera que su incubación con la endonucleasa correspondiente de lugar a uno (si el vector es circular) o dos (si es lineal) fragmentos que puedan ser ligados al inserto en un orden adecuado y con el mayor rendimiento posible con subproductos mínimos.
- ★ Si el sistema de transferencia y/o propagación no es muy eficiente, se requiere que contenga un marcador fenotípico de selección que permita



anular el crecimiento de las células que no lo contienen (los más comunes son genes que codifican resistencia a antibióticos).

- ★ El rendimiento de varios sistemas de transferencia de ADN es inversamente proporcional al tamaño de la molécula, por lo que es muy ventajoso que el vector tenga un tamaño pequeño, eso favorece la entrada del recombinante a la célula y, al mismo tiempo, deja disponible un espacio mayor para el inserto.

Además de esas condiciones, algunos vectores ofrecen otras muchas ventajas. Las sucesivas exigencias del trabajo de transfección se han ido superando a base de dotar a la molécula vector de distintas funciones adicionales, así:

- ★ Marcadores de selección alternativos que permitan el uso de distintas vías e, incluso, la detección de recombinantes por ejemplo, mediante el sistema de inactivación por inserción que aporta el plásmido vector pBR322 o el de las proteínas fluorescentes como la verde pEGFP.
- ★ Señales diversas de expresión que dirijan y controlen la lectura del inserto por parte de la maquinaria transcripcional celular, es necesario tener en cuenta la compatibilidad entre señales y maquinaria a fin de que la expresión se dé adecuadamente.
- ★ Sitios múltiples de transfección o *polylinkers*, secuencias casi siempre sintéticas en las que se ha agrupado un número alto de sitios de restricción, incorporados a un vector del que se han eliminado los sitios homólogos a éstos, aumentan su versatilidad para unirse a insertos con diferentes extremos (Perera y cols, 2002).

### **Características de la célula receptora**

Las células receptoras que pueden usarse son:

- ★ *E. coli*, la especie receptora más utilizada y en la que se desarrolla la mayor parte del trabajo sistemático de transformación
- ★ Otras bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas
- ★ Las levaduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*
- ★ Las plantas superiores, objetivo de muy variados trabajos de transgénesis



- ★ Líneas celulares de tejidos animales, capaces de crecimiento *in vitro*, sistemas receptores muy útiles para el trabajo con genes de organismos superiores y blanco de las inmensas expectativas de terapia génica
- ★ Embriones de animales, fuente para la obtención de individuos transgénicos, de extraordinario interés para el conocimiento de la biología de organismos superiores.

La célula receptora debe aceptar el ADN exógeno sin afectar su integridad y debe permitir que se mantenga estable en sus descendientes. Sus sistemas celulares deben ser capaces de llevar a cabo la replicación y expresión del inserto a través de su interacción con las señales activas presentes en él (Perera y cols, 2002).

### **Métodos de transfección**

Existen diversos métodos por el cual se puede transferir ADN exógeno a una célula receptora, se basan en principios diferentes y su efectividad depende del tipo celular al que se aplica. La elección del procedimiento más adecuado depende fundamentalmente de la naturaleza de la célula receptora, así como la del ADN recombinante que se transfiere, estos métodos son:

**1.- Métodos físicos.-** Basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula.

- ★ *La electroporación.-* Es una técnica que se basa en la aplicación de un elevado voltaje a las células durante un periodo de tiempo muy corto. Durante ese tiempo las células despolarizan sus membranas y se forman pequeños orificios por los que penetran las moléculas (proteínas y/o ADN) que se encuentran alrededor. Pasada la despolarización muchas células sufren daños irreparables y mueren (en muchos casos más del 90%) pero algunas del 5 al 10%, se recuperan e incorporan las moléculas deseadas. La ventaja de esta técnica es que se aplica a millones de células a la vez y habitualmente se obtienen eficiencias de entrada de las moléculas del 100% de las células que sobreviven (centenares de miles a millones). Es una técnica que requiere su ajuste fino para cada tipo celular, a fin de determinar las condiciones óptimas de duración y potencia del pulso. Se busca siempre el mejor equilibrio entre las condiciones que aseguran la entrada en la célula y las que maximizan la viabilidad celular.





- ★ *La microinyección.*- Es una tecnología que permite la introducción mecánica de soluciones en el interior de la célula mediante una micropipeta que se controla con la ayuda de un micromanipulador bajo un microscopio. Es una técnica muy sensible, que requiere un gran adiestramiento del personal que la realiza y un equipo delicado, sofisticado y costoso. Los instrumentos modernos de microinyección manipulados por personal experto permiten realizar algunas decenas de inyecciones por hora de trabajo. Es por ello un sistema tedioso que permite manipular pocas docenas o escasos cientos de células con un gran trabajo. En la naturaleza existen sistemas de microinyección naturales, realizados por virus que inoculan a las células su ácido nucleico. Sistemas virales empleados habitualmente en la manipulación celular son los baculovirus y las células SF9 de insecto para la producción de proteínas, los adenovirus, retrovirus, entre otros sobre sistemas de células de mamífero.
  
- ★ *La Biolística.*- Es el bombardeo con microproyectiles, se basa en el uso de proyectiles esféricos hechos de un metal pesado a cuya superficie se ha unido el ADN que se quiere transferir. A través de un mecanismo especial denominado cañón, estas partículas se lanzan a gran velocidad sobre las células receptoras. El procedimiento es muy eficaz con células que tienen una membrana muy fuerte, difícil de atravesar de otra manera, como las células vegetales.

**2.- Métodos químicos.**- Basados en la formación de complejos que las células sean capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica (fosfato de calcio, DEAE dextrán) o a las membranas (lipofección).

- ★ *Método del fosfato de calcio (Ca-Pi).*- Basado en la obtención de un coprecipitado entre el cloruro de calcio y el ADN en una solución salina de fosfatos. Se forman unos agregados que son endocitados/fagocitados por las células. Aparentemente el agregado con calcio protege al ADN de la degradación por las nucleasas celulares. El tamaño y la calidad del precipitado es crítico para el éxito del proceso, que se ve afectado por factores tales como pequeños cambios en el pH de la solución.
  
- ★ *Método del DEAE dextrán.*- Basado en la obtención de complejos entre la resina DEAE y el ADN. Los polímeros de DEAE dextrán o polybreno tienen



una carga que les permite unirse a las moléculas de ADN cargadas negativamente. El ADN acomplejado se introduce en las células mediante choque osmótico mediante DMSO o glicerol. El uso de DEAE dextrán se limita a las transfecciones transientes.

- ★ *Método de lipofección.*- Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y ADN. El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del ADN en el citosol. Una de las posibles vías es la incorporación de liposomas a la membrana y la entrada *flip-flap*. Existen un gran número de lípidos que se emplean en lipofección, aunque existe un consenso de un lípido catiónico sintético, a partir de la cual se han diseñado muchas variantes. Es esencial optimizar las condiciones específicas de transfección para obtener buenas eficiencias, que suelen ser en buenas condiciones de entre el 70 y el 90% de las células de la placa. Las desventajas del método son, aparte del elevado precio de los lípidos, el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, y que hay que optimizar el ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son la relación entre lípido y ADN (relación de cargas), la cantidad de ADN empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero.

Una vez incorporado el ADN a la célula habrá un efecto el cual permitirá seleccionar células que hayan incorporado el ADN. Este sería el caso del aislamiento de clones celulares que presentarán expresión de un determinado producto. Es posible por la incorporación en el propio vector de marcadores de selección, típicamente la resistencia a G418 (análogo a neomicina), también es posible a las pocas horas o días detectar la presencia de la proteína codificada por el plásmido. (Perera y cols, 2002).

## **Proteína Verde Fluorescente (GFP)**

La proteína verde fluorescente, GFP por sus siglas en inglés (*Green Fluorescent Protein*), descubierta por Shimomura en 1964, es una proteína que se encuentra en forma natural en la medusa del Pacífico *Aequoria victoria* (Morin y Hastings, 1971). Los componentes requeridos para su bioluminiscencia son una fotoproteína activada con  $\text{Ca}^{2+}$  llamada aequarina, la cual emite una luz azul-verde y una proteína verde fluorescente accesoria que capta la energía de la aequarina y la re-emite como una luz verde (Morise y cols, 1974).



La proteína verde fluorescente es extremadamente estable, está compuesta de un monómero de 27-kD de 238 aminoácidos. Su fluorescencia natural es ocasionada por un único cromóforo pegado covalentemente que se origina de una secuencia interna Ser-Tyr-Gly (residuos 65, 66 y 67 respectivamente) la cual es modificada después de la traducción por ciclización y oxidación de un p-hidroxibencilidenimidazolina. Esta modificación postraduccional ocurre de dos a cuatro horas después de la síntesis y es probable que ésta sea autocatalítica (Prasher y cols, 1992; IEM y cols, 1994). El espectro de excitación de la GFP nativa de *A. victoria* (azul) tiene dos picos a 375 nm y uno más pequeño a 470 nm. Mientras que el espectro de emisión de la fluorescencia (verde) tiene un pico a 509 nm (Cubitt y cols, 1995).

Esta proteína presenta una estructura de un dominio único compacto en donde el cromóforo se encuentra localizado en el centro de la molécula, lo cual le proporciona algunas ventajas, como:

1) Resistencia a la desnaturalización con tratamientos de guanidina-HCl 6 M, urea 8 M, SDS al 1% y dos días de tratamiento con varias proteasas tales como: tripsina, quimiotripsina o papaína a concentraciones de hasta 1 mg/ml. Es estable en amortiguadores neutros hasta 65° C y muestra un amplio rango de estabilidad ante pH de 5.5 a 12;

2) Deleciones en la secuencia de aminoácidos, en particular del residuo más allá de la metionina del extremo N-terminal o más de siete aminoácidos del extremo C-terminal, resultan en la pérdida total de la fluorescencia aún cuando las características del espectro de absorción del cromóforo se encuentren intactas.

3) La GFP puede ser fusionada a otras proteínas tanto a su extremo N-terminal o C-terminal. Este hecho es debido a que ambos extremos de la proteína GFP parecen ser flexibles con respecto a la estructura beta-can, denominada así, por la forma estructural de la proteína la cual presenta 11 pliegues antiparalelos beta en la parte externa formando así un cilindro muy compacto parecido a una lata, por lo que la estructura de la GFP no se distorsiona significativamente por la fusión con otras proteínas (Yang y cols, 1996).

Una de las aplicaciones más exitosas, es fusionarla con otras proteínas y así monitorear la localización y características de las proteínas de interés utilizando a la GFP como marcador o bandera. La fusión es realizada utilizando la secuencia del gen



que codifica para la GFP junto con la secuencia del gen que codifica para la proteína de interés y la quimera resultante se introduce a la célula blanco de forma de que se exprese manteniendo las funciones normales. Ya que el tamaño y la forma de la GFP y los diferentes pHs así como el potencial redox de los diferentes organelos celulares no parecen ser una barrera importante en la expresión de esta proteína, se han obtenido resultados exitosos al expresar y localizar quimeras con la GFP en núcleo, mitocondrias, vesículas secretoras, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, peroxisomas, vacuolas, fagosomas, citoesqueleto y la membrana plasmática permitiendo así su análisis *in vivo*.

Por otra parte la enorme flexibilidad que tiene como marcador no invasivo en células vivas sirve para otras numerosas aplicaciones tales como, utilizarla como control en experimentos de transfección, monitorear la proteína en células vivas, marcar células para protocolos de separación de células activadas por fluorescencia (FACS), la expresión de genes reporteros y como una medida en el estudio de interacciones proteína-proteína (Tsien, 1998; Mitra y cols, 1996).

Los principales factores que afectan la expresión o de los cuales depende la detectabilidad de la GFP son los siguientes: cantidad total de la GFP (número de copias del gen y duración de la expresión), eficiencia de la formación del cromóforo después de la traducción esto es, disponibilidad de los chaperones, tiempo, temperatura, propiedades moleculares de la GFP madura o dimerización, competencia con otras señales de fondo o con autofluorescencia de células o medio de cultivo, calidad de excitación y filtros de emisión, además, la proteína requiere de la presencia de oxígeno para su expresión en las etapas tempranas, particularmente para el deshidrogenado de los enlaces  $\alpha$  y  $\beta$  del residuo 66 que se localiza en el cromóforo. Una vez que la proteína ha madurado el oxígeno no tiene efecto (Tsien, 1998).

La GFP silvestre ha sido modificada de varias maneras tanto para la optimización de la fluorescencia, así como para una mayor expresión y estabilidad en diferentes sistemas eucarióticos.

Existen diferentes variantes de la GFP dentro de las cuales esta la llamada proteína verde fluorescente aumentada o EGFP por sus siglas en inglés (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Esta proteína ha sido modificada para optimizar la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero (excitación máxima = 488 nm, emisión máxima = 507 nm). El plásmido pEGFP codifica la variante



GFPmut1 que contiene una sustitución de doble aminoácido de Phe-64 a Leu y Ser-65 a Thr, además la secuencia que codifica a la EGFP contiene más de 190 cambios de base silenciosos que corresponden al uso de codones de humano. La secuencia flanqueante río arriba ha sido convertida al sitio de inicio de la traducción de Kozak para aumentar la eficiencia de traducción en células eucarióticas. El cromóforo de la EGFP tiene una fluorescencia 35 veces más alta que la GFP. Sin embargo la proteína requiere de promotores fuertes para su expresión, tales como el del citomegalovirus (CMV), CV40 y el del VIH, para que la detección sea apreciable y más aún en células de mamífero (Tsien, 1998).

Westphal y colaboradores en 1997, fusionaron a la proteína verde fluorescente con actina (GFP-Actina), demostrando que con el uso de proteínas de fusión a moléculas fluorescentes es posible estudiar y monitorear la dinámica de la actina en cuanto a su acumulación y desensamblaje en células vivas, además de que con ello se puede omitir el uso de faloidina o anticuerpos marcados, los cuales solo pueden ser usados con células fijadas. También, la mayoría de la GFP-actina transfectada o exógena, podía ser visualizada en mayor proporción como F-actina. Por otro lado una de las aplicaciones más interesantes de la GFP-actina es el monitoreo del ensamblaje y desensamblaje de la actina observando los cambios en la forma y el comportamiento en células que se mueven rápidamente. Ejemplo de esto es el trabajo de Ballestrem y colaboradores en 1998, que estudiaron la dinámica de actina en células vivas de mamífero, por medio de la transfección de células B16F1, Fibroblastos 3T3, células CHO y células t.Ent3 con la proteína de fusión verde fluorescente (EGFP) y  $\beta$ -actina, encontrando que esta quimera provee una importante herramienta para el estudio de los cambios dinámicos de las diferentes estructuras del citoesqueleto de actina, ya que los microfilamentos se encuentran relacionados con un vasto número de funciones celulares, la fusión de EGFP y la  $\beta$ -actina, puede ayudar a dar una idea más clara de la función de esta proteína en células vivas. También, Wittenmayer y colaboradores en el 2000, caracterizaron de forma funcional a la proteína verde fluorescente fusionada con la proteína profilina, molécula considerada como un importante regulador de la dinámica de la F-actina en las células. Ellos probaron las fusiones de las profilinas I y II provenientes de ratón con la GFP unida a su extremo N-terminal y al extremo C-terminal para cada una, expresándolas en *E. coli* y observando la afinidad de ésta en poliprolina-sefarosa, cuantificando la afinidad por medio de ensayos de polimerización, también, se pusieron a interactuar con la VASP, un ligando rico en prolina para profilina analizando por medio de ELISA y la unión de las proteínas a PtdIns; sus



resultados muestran que la fusión de la GFP al extremo C-terminal de la profilina I disminuye la unión a la prolina. En contraste la otra fusión de la proteína se une a la poliprolina-sefarosa y a la VASP. La unión a la PtdIns no fue significativamente alterada. Además, la fusión de cada una de las isoformas de la proteína con la GFP no disminuye la afinidad a actina. En estudios de localización en células de mamífero, todas las fusiones mostraron la localización esperada de la profilina en las zonas de mayor polimerización-despolimerización de actina. Finalmente concluyen que la fusión de la EGFP con otras proteínas, es una herramienta de mucha utilidad en los estudios de localización celular de proteínas como profilina, la cual es de tamaño pequeño en comparación con la GFP y que la fusión de la GFP a cualquiera de los dos extremos, N- y C- terminal de cada una de las isoformas de la proteína profilina, permite obtener los dos ligandos de unión y así identificar los sitios o las proteínas a las que se une, lo cual quiere decir que la inserción de la GFP en cualquiera de los dos extremos no afecta la expresión.



## Antecedentes directos

La obtención de mutantes deficientes en actina utilizando métodos de transfección para estudiar proteínas de citoesqueleto no ha sido posible hasta ahora, ya que la mayoría de las proteínas que lo componen pertenecen a familias multigénicas dificultando las estrategias de reemplazo de genes (*knock-out*). Una estrategia alternativa es la obtención de mutantes dominantes negativas en donde la sobreexpresión o la expresión de una proteína mutada altera la función normal de la proteína endógena. Por ejemplo, Schevzov y colaboradores en 1992, estudiaron el impacto en la citoarquitectura de mioblastos C2 al sobreexpresar los genes  $\beta$ - y  $\gamma$ -actina, introduciendo las secuencias de cada uno por medio de transfección con la técnica de co-precipitación con fosfato de calcio. Ellos observaron que al expresar estos genes en las células, no son equivalentes y que la sobreexpresión de ambos genes resulta en cambios en la expresión relativa de los genes de  $\beta$ - y  $\gamma$ -actina. Altos niveles de expresión del gen de la  $\beta$ -actina resulta en un incremento en el área de las células y en contraste altos niveles de expresión del gen de la  $\gamma$ -actina, resultan en un decremento significativo en el área de las células. Los cambios en la citoarquitectura de las células al introducir los genes de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -actina humana provocó la alteración en la organización de los filamentos. La comparación de sus datos les sugiere fuertemente que los dos genes transfectados en las células no son equivalentes y probablemente estos dos genes codifican información estructural diferente para las células. También, Hinz Boris y colaboradores en el 2003, realizaron estudios determinando los niveles de expresión y localización de las isoactinas, así como de su interacción con ABPs que se cree modulan la función de actina dentro de la célula, utilizando sistemas en los que se expresa una isoactina exógena. Los resultados han permitido observar la regulación de la expresión de las isoactinas endógenas, establecer diferencias cuantitativas en la unión con ABPs y sugerir la localización y utilización preferencial de isoactinas para ciertas funciones.



## Justificación

El citoesqueleto de actina participa de manera importante en los procesos de infección de diversos microorganismos patógenos intracelulares, como *Trypanosoma cruzi*. Aún cuando en los últimos años se han realizado avances en el conocimiento de los mecanismos de invasión a la célula hospedera por dicho parásito, permanecen varias preguntas aún sin contestar y otras en controversia. La falta de herramientas moleculares que proporcionen evidencias directas ha sido una limitante importante.

Como se mencionó anteriormente, el estudio de los mecanismos de invasión de *T. cruzi* ha sido abordado utilizando estrategias indirectas con drogas que alteran los microfilamentos de actina como la citocalacina D o B, faloidina y lantruculina. En unos reportes utilizan dichas drogas durante el experimento lo que pudiera estar afectando también al parásito, en otros utilizan células pretratadas en donde su efecto es rápidamente reversible lo que ha dado lugar a resultados contradictorios. Además si consideramos que algunas de estas drogas pueden tener mas de una molécula blanco dificultan aún más la interpretación de los resultados

Para resolver este problema proponemos en este proyecto el uso de estrategias moleculares en donde únicamente los microfilamentos de la célula hospedera se encuentren alterados, para lo que planteamos los siguientes objetivos.





## Objetivos

Obtener transfectantes estables de la línea celular MDCK con ADN de los plásmidos pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>w</sup>.

Analizar la organización del citoesqueleto de actina y el fenotipo de las células transfectadas (A<sup>+</sup> y Mut) comparando con las células control (WT y Mock).

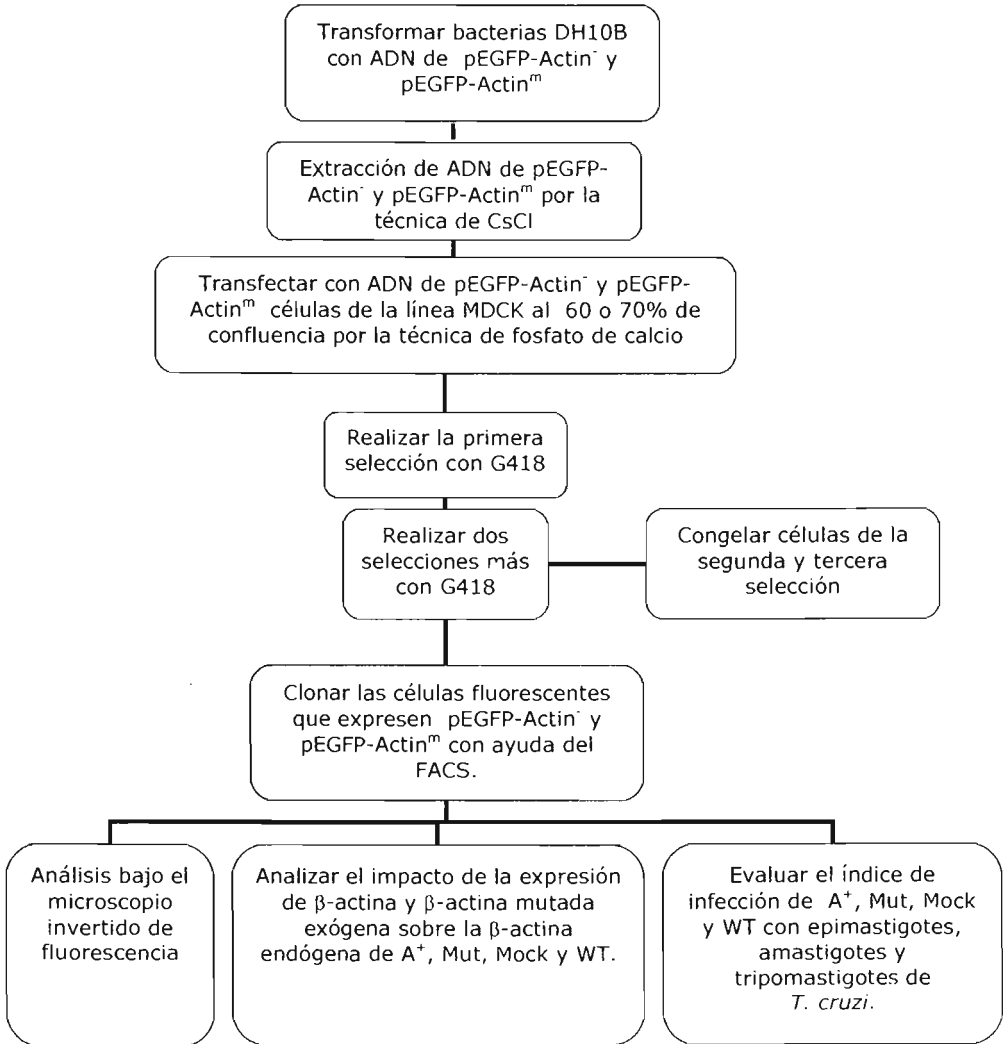
Determinar el efecto de la expresión de  $\beta$ -actina exógena (A<sup>+</sup>) y  $\beta$ -actina exógena mutada (Mut) sobre la expresión de  $\beta$ -actina endógena.

Determinar la cinética de infección de amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes en células epiteliales MDCK y RK13, y fibroblastos 3T3 S y NIH.

Evaluar la participación de actina durante la infección de amastigote, epimastigote y tripomastigote de *Trypanosoma cruzi* en células transfectadas expresando una actina truncada (Mut) y células control (WT y Mock).



## Esquema experimental



## Materiales y métodos

Tabla 1. Lista de reactivos y sus componentes utilizados

REACTIVO	COMPONENTES
<b>TFB II</b>	MOPS 10mM, CaCl <sub>2</sub> mM, KCl 10mM, glicerol 15%
<b>Buffer P1</b>	Tris-Cl 5mM pH 8, EDTA 10mM y 100 µg/ml=6 g Trisbase, 3.72 g de NaEDTA·2H <sub>2</sub> O en 800 ml de agua se ajusta el pH a 8 con HCl y se afora a 1 L.
<b>Buffer P2</b>	NaOH 200mM, 1% SDS=8g NaOH en 950 ml de agua, 50 ml de SDS al 20%, para 1 L
<b>Buffer P3</b>	Acetato de potasio 3 M pH 5.5=29.4 g de acetato de potasio en 500 ml de agua. Al que se le ajusta el pH a 5.5 con ácido acético glacial=110 ml para 1 L
<b>TE pH 8</b>	2 ml Tris-Cl 10mM, 200 µl EDTA 1mM y 0.1 L de agua milliQ
<b>TBE</b>	54 g Tris-base 5X, 27.5 g ac. bórico, 20 ml EDTA 0.5M
<b>PBS 1X</b>	8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 800 ml H <sub>2</sub> O
<b>HBS</b>	NaCl HEPES, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro
<b>Buffer de muestra para extracción de proteínas</b>	1.51 g de Tris-OH, 2 g SDS, 25 g de glicerol, 0.002 g pironina, ajustar el pH a 6.8 y aforar a 100 ml
<b>Solución A para cuantificar proteínas por el método de Lowry</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2 % en Na <sub>4</sub> OH 0.1 N
<b>Solución B para cuantificar proteínas por el método de Lowry</b>	0.5 ml CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 1%, 0.5 ml de tartrato de sodio y potasio al 20 %
<b>Solución C para cuantificar proteínas por el método de Lowry</b>	50 ml de solución A, 1 ml de la solución B
<b>Solución D para cuantificar proteínas por el método de Lowry</b>	Reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu diluido v/v con H <sub>2</sub> O
<b>Separador en SDS-PAGE</b>	3 ml de buffer pH 8.8, 4 ml de acrilamida-bisacrilamida 10%, 5 ml de H <sub>2</sub> O estéril, 60 µl de TEMED, 120 µl de persulfato de amonio 12%
<b>Concentrador en SDS-PAGE</b>	1 ml de buffer pH 6.8, 1.5 ml de acrilamida-bisacrilamida 10%, 3 ml de H <sub>2</sub> O estéril, 40 µl de TEMED, 80 µl de persulfato de amonio 12%
<b>Buffer de muestra de SDS-PAGE</b>	SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 100 mM, Tris pH 6.8 60 mM, Azul de bromofenol 0.001%
<b>Buffer de corrida</b>	14.41 g glicina, 3.02 Tris-OH, 1 g SDS aforar a 1 L con H <sub>2</sub> O
<b>Buffer de transferencia</b>	2.9 g Tris mM, 14.5 g glicina 190 mM, 200 ml metanol y aforar a 1L



## Plásmidos

Los plásmidos utilizados como vectores de transfección fueron pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>r</sup> obtenidos en un trabajo previo a partir del plásmido comercial pEGFP-Actin de Clontech.

El plásmido de pEGFP-Actin<sup>m</sup> codifica para una proteína de fusión entre la EGFP y  $\beta$ -actina<sup>m</sup> (a la que se removieron 174 nucleótidos (nc) internos de los 1127 que codifican para la  $\beta$ -actina), bajo el promotor y las señales de poliadenilación de SV40. El esqueleto del vector contiene el sitio ORI de SV40 que permite la replicación del vector en cualquier línea celular de mamífero, además de una secuencia de resistencia a Neomicina (Neo<sup>r</sup>) bajo el promotor temprano de SV40 así como un gen de resistencia a neomicina/kanamicina de Tn5 y la señal de poliadenilación de la Timidina cinasa (HSV-TK) del virus del herpes simple, lo que permite la transfección estable del plásmido en células eucariontes bajo la selección de G418. Este vector también contiene un promotor río arriba que permite la expresión del gen que codifica para kanamicina para la selección en bacterias, un sitio de origen de replicación pUC para su propagación en *E. coli* y un origen f1 para la producción de ADN de una sola hebra. Este vector ya había sido obtenido en el laboratorio en trabajos previos.

El plásmido pEGFP-Actin<sup>r</sup> fue obtenido digiriendo pEGFP-Actin con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Bam*H I, eliminado la secuencia completa que codifica para la  $\beta$ -actina, por lo que únicamente codifica para la proteína verde fluorescente.

## Transformación

Para la obtención del ADN de pEGFP-Actin<sup>r</sup> y pEGFP-Actin<sup>m</sup> que se usarán para los experimentos de transfección, se realiza la técnica de la transformación la cual consiste en la transferencia de ADN de dichos vectores al interior de una célula bacteriana receptora. Este proceso introduce el ADN en las células bacterianas para llevar a cabo su replicación o clonación y obtener así un gran número de células portadoras de la misma molécula recombinante.

La técnica se realiza colocando en un tubo de ensaye de vidrio pre-enfriado 25 ng del ADN, se mezclan con 100  $\mu$ l de solución TFB II fría y se mezcla suavemente con la punta de la pipeta, a esta mezcla se adicionan 50  $\mu$ l de las bacterias calcio-competentes DH10B. Todo debe realizarse en condiciones de -20° C y sin tocar las paredes del tubo contenedor. La mezcla se incuba a 4° C por 10 min sin mover para



propiciar que el ADN adicionado se adhiriera a la pared celular de las bacterias, posteriormente se les da un choque térmico a 42° C durante 1½ min exactos, esto facilita que la bacteria pueda incorporar el ADN. Después de este lapso de tiempo las células son enfriadas en hielo por 2 min y colocadas a temperatura ambiente (T° amb.) 5 min, al final se agregan 1 ml de medio LB y se colocan a 37° C durante 1 hr en agitación continua. Del total de la transformación se toman 300 µl de una dilución 1/10 para plaquear en cajas Petri con medio LB las cuales contienen Kanamicina en una concentración de 30 µg/ml y se incuban a 37° C hasta que haya crecimiento de colonias, aproximadamente 16 hrs. Las colonias que hayan crecido son colonias positivas y tienen integrado el plásmido de interés.

### **Obtención y extracción del ADN de plásmido por CsCl**

Se eligió una colonia positiva obtenida de la transformación para realizar la extracción del ADN de plásmido por la técnica de gradientes de equilibrio de cloruro de cesio (CsCl)-Bromuro de Etidio (Sambrook, 1989).

La técnica se basa en la obtención del ADN por medio de cultivos a gran escala de bacterias que presenten este ADN. Se pica una colonia positiva de un cultivo fresco con Kanamicina y se inocular en 5 ml de medio LB en un tubo con 30 µg/ml de Kanamicina, se incuba por 8 hrs a 37° C con agitación vigorosa de 300 rpm. El cultivo obtenido se diluye en una proporción de 1/1000 en medio LB con 30 µg/ml de Kanamicina, se crece a 37° C por 12 ó 16 hrs con agitación de 300 rpm. Se recuperan las células bacterianas centrifugando a 6000 rpm en rotor Sorvall GSA por 15 min a 4° C. Se resuspende la pastilla en 10 ml de buffer P1, se le agrega RNAsa a una concentración final de 100 µg/ml. Se adiciona 10 ml de buffer P2. Mezclar suavemente por inversión 4 o 6 veces y se incuban a T° amb por 5 min. No se agita en vortex ya que se puede romper el ADN genómico. Se adicionan 10 ml de buffer P3, se mezcla suavemente por inversión de 3 a 6 veces hasta despegar toda la muestra de las paredes del tubo de vidrio se incuban en hielo por 20 min. La precipitación aumenta si el buffer P3 está frío y si se incuban en hielo. Se centrifuga en rotor SS34 a 9000 rpm 1 hr, se recupera el sobrenadante y se agrega un volumen igual de isopropanol se incuban a 4° C toda la noche. Se recuperan la pastilla centrifugando a 8500 rpm 1 hr, con 3 ml de TE pH 8. Se agregan 4 g de CsCl y se agita con vortex hasta disolverlo y se coloca la mezcla en un tubo de ultracentrifuga. Se agrega 500 µl de EtBr (5 mg/ml), se mezcla en el vortex y se centrifuga en el rotor NVT90 a 90,000 rpm 3 hrs a 18° C, la



banda obtenida se recupera en la oscuridad haciendo incidir luz UV sobre el tubo para que fluoresca el ADN marcado con el bromuro de etidio. Se lava el ADN con butanol saturado de agua 1:1 hasta eliminar completamente el EtBr, al ADN limpio se le agrega 3 volúmenes de EtOH al 70 %, se incuba toda la noche a  $-20^{\circ}$  C. Se centrifuga para lavar la pastilla con EtOH frío al 80% y se resuspende la pastilla en 500  $\mu$ l de TE pH 8. Se extrae el ADN con un volumen de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se recupera la fase acuosa y se agrega un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), para eliminar completamente el fenol, se precipita la pastilla con 1:10 volúmenes de acetato de sodio 3 M reposando 5 min en hielo. Se agregan 2.5 volúmenes de EtOH absoluto y se congela 20 min a  $-70^{\circ}$  C, se observa la formación de una red de ADN la cual se centrifuga para lavar con EtOH al 70 % frío. Se elimina el EtOH completamente y se resuspende la pastilla en 500  $\mu$ l de TE pH 8. El ADN obtenido se cuantifica por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm y se corre en un gel de agarosa en TBE.

### **Electroforesis en geles de agarosa**

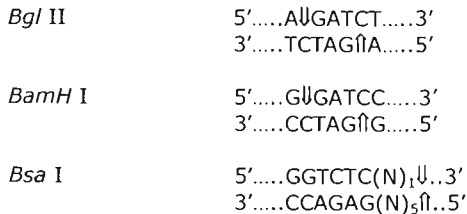
Es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular para analizar fragmentos normalmente cortos de ADN. Mediante un campo eléctrico se hacen fluir los ácidos nucleicos en una matriz porosa como la agarosa. La migración del ADN depende de: el voltaje aplicado, las condiciones salinas del medio (buffer), la posible conformación del ácido nucleico y el tamaño del poro de la matriz. El tamaño de la molécula de ADN será lo que defina su migración durante la electroforesis. Las moléculas de ADN son de pH alcalino y carga negativa uniforme, lo que permite que migren hacia el ánodo (+). Una vez separadas, las moléculas de ADN se tiñen con bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases de ADN y al iluminar con UV da un color naranja detectable fotográficamente. Se utilizaron geles de agarosa a una concentración de 1 %, lo que da un rango efectivo de resolución de 10 - 0.5 kb.

### **Digestión con enzimas de restricción**

Una digestión es el proceso por el cual se hacen cortes específicos por medio de enzimas de restricción que cortan al ADN en fragmentos más pequeños. Dichas enzimas cortan los enlaces fosfodiéster del ADN de doble cadena en sitios específicos dentro de una secuencia de reconocimiento o en un sitio adyacente a ésta produciendo un extremo 5'-fosfato y otro 3'-OH para dejar extremos "romos" (si se corta el ADN exactamente en el eje de simetría de su secuencia de reconocimiento), o bien,



“pegajosos” o cohesivos (si se cortan las cadenas en lugares similares según el eje de simetría). Las enzimas de restricción han sido clasificadas en tres tipos, siendo las enzimas de restricción tipo II las que reconocen secuencias palindrómicas específicas de 4-6 nucleótidos de longitud y muestran tanto actividad de endonucleasa (corta en sitios específicos) como de metilasa (modifica la secuencia de reconocimiento). Se utilizaron las enzimas de restricción tipo II de un solo corte para deletar el fragmento de ADN que codifica para  $\beta$ -actina, estas enzimas son: *Bgl* II, *Bam*H I que tienen su sitio de corte a los 1340 y 2480, respectivamente, del vector pEGFP-Actin de 5820 pb dejando ambos extremos cohesivos; *Bsa* I con dos sitios de corte a 1718 y 4834 pb dejando extremos romos:



### Cultivos celulares

La línea celular MDCK se cultivó en medio modificado Eagle-Dulbecco-Vöigt (DMEM) complementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), insulina al 1  $\mu$ g (Eli Lilly), 100  $\mu$ g/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina (IN VITRO). Los cultivos se crecieron en botellas desechables para cultivo de 25cm<sup>2</sup>, en una incubadora con atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO<sub>2</sub> a 37° C (Forma Scientific). El pH se mantuvo en un intervalo de entre 7.2-7.4. Las células se desprendieron para su resiembra cuando se encontraban del 95-100% de confluencia utilizando una solución de tripsina-versen al 0.05% (IN VITRO) previamente lavadas con PBS 1X.

### Transfección de células MDCK

La transfección de las células MDCK con los vectores de expresión pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>r</sup>, se realizaron por la técnica de co-precipitación con fosfato de calcio (Ca-Pi) (Jordan y cols, 1996), con algunas modificaciones. Utilizando 10  $\mu$ g de ADN de cada vector (pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>r</sup>) previamente precipitados con 1:10 volúmenes de acetato de sodio 3 M 5 min en hielo y 2.5 volúmenes de EtOH absoluto, para una mejor precipitación se congela 20 min a -70° C, se centrifuga y se lava la pastilla con EtOH al 80 % frío, se seca el EtOH completamente y se resuspende la



pastilla en 8  $\mu\text{l}$  de agua Milli-Q estéril. Cada uno de los plásmidos, fue mezclado con 100  $\mu\text{l}$  de una solución 1:1 de  $\text{CaCl}_2$  0.25 M y HBS 2X pH 7.05, se incuba durante 20 min a  $T^\circ$  amb, hasta formar un precipitado fino. Las células se siembran 24 hrs antes, a una densidad de  $6 \times 10^5$  células/ml, para obtener una confluencia del 70 % en 24 hrs a  $37^\circ\text{C}$  con 5 % de  $\text{CO}_2$ . A estas células se les adiciona la solución de ADN/ $\text{CaCl}_2$ /HBS 2X, lentamente y se incuban. Después de 24 horas se les da un tratamiento con glicerol al 15 % en un buffer HEPES/NaCl, para aumentar la eficiencia de transfección, la cual se adiciona a la monocapa previa extracción del medio, adicionando 1 ml de solución durante 3 min a  $37^\circ\text{C}$  y se lava la monocapa con PBS 1X, dos veces y una vez con medio DMEM sin complementar, por último se le adiciona medio DMEM complementado fresco e incubar a  $37^\circ\text{C}$  con 5 % de  $\text{CO}_2$  por 24 hrs. Se realiza la primera selección para distinguir transfectantes estables adicionando G418 (Geneticina, droga análoga a neomicina) a una concentración final de 600  $\mu\text{g/ml}$ , se realiza el cambio de medio y droga cada 72 o 96 hrs por la subsecuente muerte de aquellas células que no han integrado el vector que confiere la resistencia a G418. Después de dos o tres semanas sólo quedan las colonias de células resistentes a la droga. El monitoreo se lleva a cabo por medio de un microscopio invertido marca *Olympus* de fluorescencia con el filtro verde, se hicieron dos selecciones y posteriormente estas fueron despegadas de la monocapa con tripsina-versen para dividir las en dos partes, una resiembra que se conserva para realizar los experimentos posteriores y la otra fue congelada para mantener un banco de reserva.

Se congelaron células de segunda selección con G418 para mantener una reserva, para obtener un buen proceso de congelación se siembran células a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml en botellas de 25  $\text{cm}^2$  con 5 ml de medio DMEM complementado, con un cambio de medio a las 24 hrs de incubación, la congelación se realizó a las 48 hrs de incubación lavando a las células con PBS 1X a  $37^\circ\text{C}$ , se despegan las células con 800  $\mu\text{l}$  de tripsina-versen 0.05% dejando actuar durante 10-20 min. Se centrifuga a 1800 rpm por 5 min y se resuspende la pastilla en medio DMEM y se cuantifican las células en una cámara de Neubauer para obtener una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml. Se centrifugar y se resuspende la pastilla con una mezcla de DMEM+Dimetil sulfóxido (DMSO al 10%) cuidadosamente. Se coloca la suspensión en tubos de congelación (criotubos), previamente etiquetados. El DMSO es muy tóxico para las células por lo que debe utilizarse frío y trabajarse lo más rápido posible para disminuir el efecto tóxico de esta forma se colocan las células en hielo y los criotubos estériles se deben congelar 24 hrs antes de utilizarse a  $-70^\circ\text{C}$ . Las





células fueron colocadas a  $-20^{\circ}$  C durante 1 hr, luego se pasan al congelador REVCO a  $-70^{\circ}$  C por 24 hrs. Finalmente, los tubos son colocados en  $N_2$  líquido. Después de siete días se descongela un tubo al azar para realizar una prueba de viabilidad.

Para descongelar células se extrae un tubo del  $N_2$  líquido, pasándolo rápidamente a un vaso con agua a  $37^{\circ}$  C. Se agregan 5 ml de medio DMEM y se centrifuga a 1800 rpm por 5' para eliminar el DMSO, la pastilla se resuspende en 5 ml de medio DMEM complementado. Las células se siembran en cajas de cultivo a alta densidad, incubando a  $37^{\circ}$  C con 5 % de  $CO_2$ . Después de que las células llegan a confluencia se les da un pase 1:2 y posteriormente un pase 1:5, después de esto se sigue con el pase normal recomendado.

### **Clonación de células transfectadas de manera estable**

La clonación de células es una técnica utilizada para homogenizar una población celular de la cual se espera que todos sus integrantes tengan el mismo ADN, así, se realiza la clonación obteniendo poblaciones celulares provenientes de una misma célula. Este procedimiento se lleva a cabo por citometría de flujo o FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) ADVANTIX. La preparación de las células consiste en despegarlas con tripsina y resuspenderlas en medio DMEM, se colocan en tubos para el citómetro 1 hr antes de separarlas en el citómetro de flujo, en este tiempo deben estar a  $37^{\circ}$  C, debe procurarse que las células queden bien disgregadas. Por otro lado en placas de 96 pozos se colocan 100  $\mu$ l de medio DMEM complementado, el citómetro colocará una célula/pozo y separará a las células de alta fluorescencia, se incuban a  $37^{\circ}$  C con 5 % de  $CO_2$  de 1-2 semanas, hasta que haya un claro crecimiento. Cuando las células lleguen a confluencia se expande la población sembrándolas en una caja más grande (cajas Petri para cultivo celular de 30 mm de diámetro), posteriormente se les dio un pase 1:2 hasta llegar a darles el pase recomendado. Una parte de cada clona fue congelada y la otra fue utilizada para los experimentos subsecuentes.

### **Tinción de F-actina con faloidina rodaminada**

La faloidina es una toxina del hongo *Amanita faloides* que se une fuertemente a ambos extremos de los filamentos de actina y los estabiliza, impidiendo su despolimerización, por sus propiedades fluorescentes es ampliamente utilizada para marcar de color rojo los filamentos en células fijadas (Alberts y cols, 1993).



Para la tinción directa con faloidina en las células MDCK, estas fueron sembradas en cajas Petri de 30 mm de diámetro, sobre cubreobjetos tratados con EtOH absoluto y flameados, la caja contiene medio DMEM complementado, se incuban a 37° C con 5 % de CO<sub>2</sub> hasta que lleguen a la fase logarítmica en subconfluencia (70% de crecimiento) y también deben de extraerse otras muestras en confluencia (90% de crecimiento), las células son lavadas con PBS 1X a 37° C tres veces y fijadas con 1 ml de formaldehído al 3.7% (en PBS 1X) (Grado ultra puro, Tousimis Research Co.) durante 20 min a T° amb, se remueve el formaldehído lavando con PBS 1X y se permeabilizan con acetona durante 5 min a -20° C. Se toman 10 µl de faloidina-rodaminada concentrada y se diluye en 200 µl de PBS 1X, de esta solución de faloidina se agregan 25 µl a cada cubreobjetos con células y se incuban durante 20 min a T° amb, finalmente, las células en los cubreobjetos son montadas en portaobjetos con una gota de Gelvatol. Las laminillas son etiquetadas y almacenadas a -20° C protegidas de la luz para su posterior análisis al microscopio de fluorescencia.

### **Extracción y cuantificación de proteínas totales**

Se colocan células en cajas Petri de 10 cm de diámetro (4 por cada línea transfectada), para obtener una buena cantidad y se toman del 90-95 % de confluencia, se lavan 3 veces con PBS 1X, para poder extraer la proteína total se deben lisar las células para lo cual se agregan 400 µl de una mezcla 1:1 de amortiguador de muestra 2X y una mezcla de inhibidores (complete) de proteasas 50X. Con ayuda de un gendarme (Gibco) se raspa la monocapa hasta formar una solución viscosa, la cual se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 ml, todo esto debe realizarse en hielo para evitar que se degrade la proteína. Para asegurar la lisis celular y liberar la proteína se sónica a 40 amperes por 15 segundos. La proteína se cuantifica por el método de Lowry (Lowry y cols, 1951), con una curva patrón con 5, 10, 15, 20, 25 y 30 µg de BSA recién preparada y se lleva a un volumen final de 200 µl con agua milli-Q estéril. Se prepara un blanco únicamente con los 200 µl de agua milli-Q estéril. Las muestras se tratan colocando 1 µl de la proteína en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se lleva a un volumen final de 200 µl con agua milli-Q estéril. A todos los tubos se les agrega 1 ml de solución C fresca, se agita en el vortex y se dejan reposando 10 min a T° amb. Se agregan 100 µl de la solución D, se agita en vortex e incuba a T° amb por 30 min. Por último se lee en el espectrofotómetro visible a una longitud de onda de 750 nm y se grafica concentración contra DO y se interpolan los resultados de las muestras para calcular la concentración de las mismas.



### **Electroforesis de proteínas SDS-PAGE**

La electroforesis de proteínas SDS-PAGE se hace en un gel de poliacrilamida de 1.5 mm de grosor usando cámaras de preparación de BIO-RAD, el gel contiene dos fases un separador y un concentrador. El SDS-PAGE tiene su fundamento en la matriz de gel de poliacrilamida que se prepara por una polimerización iniciada por radicales libres. La acrilamida se polimeriza linealmente mientras que la bisacrilamida sirve como agente de unión para formar una matriz tridimensional, el persulfato de amonio y el TEMED se utilizan para generar los radicales libres.

En tubos eppendorf se preparan las muestras con una concentración de 500 µg de proteína al igual que el marcador de peso y se les agrega 15 µl de buffer de muestra 2X con un exceso de SDS que desdobra la proteína en sus péptidos constitutivos y 1 µl de β-mercaptoetanol que rompe los puentes disulfuro, se calienta en agua hirviendo por 5 min, posteriormente se carga el gel que debe estar en una cámara de corrida BIO-RAD, con 800 ml de buffer de corrida al 1X, previamente enfriado, entre sus principales componentes del buffer de corrida esta el SDS que se fija en los péptidos cuantitativamente lo que les da linealidad y los carga positivamente a lo largo de la cadena sustituyendo las cargas originales de la proteína. El desplazamiento de las proteínas a través del gel de poliacrilamida en un campo eléctrico, dependerá exclusivamente de su tamaño molecular, pues el tamaño del poro del gel restringe el movimiento de las moléculas más grandes, mientras que las partículas más pequeñas son capaces de atravesar el gel más rápido. Se colocan los electrodos y se corre a 100 mVolts, 400 amperes por 2 hrs 30 min. El gel se tiñe con azul de Coomassie durante 20 min a T° amb, y se destiñe con agua bidestilada, hasta que se puedan ver las bandas de las proteínas.

### **Inmunotransferencia (*Western Blot*)**

Es una técnica utilizada para la separación y caracterización de proteínas en donde son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular del gel a una membrana de nitrocelulosa (Towbin y cols, 1979) y 800 ml de buffer de transferencia. Se verifica la transferencia tiñendo la membrana con rojo de Ponceau durante 10 min y se lava con agua bidestilada. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana, antes de colocar el primer anticuerpo se bloquean los sitios inespecíficos del papel con leche descremada Svelty



de Nestlé al 6% en PBS 1X durante 3 hrs a T° amb ó a 4° C durante toda la noche. Las proteínas se detectan inmunológicamente incubando toda la noche la membrana, primero, con un anticuerpo primario específico contra la proteína de interés, en este caso, anti- $\beta$ -actina, anti-GFP y anti-GAPDH. Se retira el exceso de anticuerpo primario y se incuba con un anticuerpo secundario conjugado con una enzima (peroxidasa) y contra la especie en la que se ha producido el primer anticuerpo, en este caso anti-ratón. Este segundo anticuerpo se pega al primero y el conjugado enzimático permitirá visualizar todo el complejo «proteína-Ab primario-Ab secundario-enzima» cuya localización se revela al incubarlo con el reactivo comercial ECL®, el cual contiene luminol que al ser oxidado por la peroxidasa produce una señal de color visible que puede detectarse sobre una película radiográfica. La presencia de bandas coloreadas indica la posición de la proteína de interés (Laemmli, 1970; Towbin y cols, 1979). Los valores fueron normalizados con respecto a GAPDH como control de carga de la misma cantidad de muestra, y con respecto a la muestra con mayor intensidad de banda (considerada como 100%) para cada grupo de  $\beta$ -actina y GFP.

#### **Infección de fibroblastos 3T3 (NIH y S) y epitelios (MDCK y RK13), con los tres estadios de desarrollo de *T. cruzi***

Se infectan fibroblastos 3T3 (NIH y S) y células epiteliales MDCK con epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes transfectados con EGFP. Las células se crecen en placas para cultivo de 24 pozos en confluencia del 70% con medio DMEM al 10% SFB para todas las líneas celulares. Los parásitos en estadio de amastigote y tripomastigote se extraen y purifican de una infección primaria en fibroblastos 3T3 NIH, el estadio de epimastigotes se purifica de un cultivo en fase logarítmica. Los tres estadios se inoculan en las cuatro líneas celulares a una densidad de  $2.27 \times 10^6$  parásitos, las células fueron incubadas a 37° C con 5 % de CO<sub>2</sub> y a las 48 hrs se les cambia el medio retirando los parásitos, se contabilizan las células infectadas en el microscopio invertido de fluorescencia cada 48 hrs.

#### **Infección de células MDCK con los tres estadios de desarrollo de *T. cruzi***

La infección de las transfectantes estables de células MDCK con pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>r</sup> se realiza con los tres estadios del parásito, no fue posible contar con la línea que expresaba pEGFP-Actin, por lo que se usan como control células WT.

Para los ensayos de infección, las células MDCK se siembran en placas de 24 pozos, a una confluencia del 40 % con medio DMEM complementado (10% SFB y sin



insulina), las células se mantienen en incubación a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> antes de infectarlas con el parásito. Antes de realizar la infección, los parásitos en estadio amastigote y tripomastigote se recuperan de una infección primaria, purificados y contabilizados, los parásitos en estadio epimastigote venían de un cultivo en fase logarítmica, también se purifican del medio en que se encontraban y se contabilizan, todos los parásitos están transfectados con la proteína EGFP. A las células se les retira el medio y se les coloca medio DMEM al 2% de SFB y se inoculan 1x10<sup>5</sup> parásitos de los tres estadios a cada línea transfectada, las células se incuban a 37° C con 5 % de CO<sub>2</sub> y a las 48 hrs se le cambia el medio retirando los parásitos, se contabilizan las células infectadas en el microscopio invertido de fluorescencia cada 48 hrs.

### **Procesamiento de imágenes**

La captura de imágenes se realiza en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de inmersión de 63X, con filtros de color verde para visualizar la actina fluorescente en las células fijadas. Para la actina marcada con faloidina, las células se observan con un filtro rojo. Las imágenes se capturan con un sistema de cómputo acoplado al microscopio y con el software Twin Viewfinder, versión 3.0 y se procesan con el software Image-Pro Plus, versión 4.0.

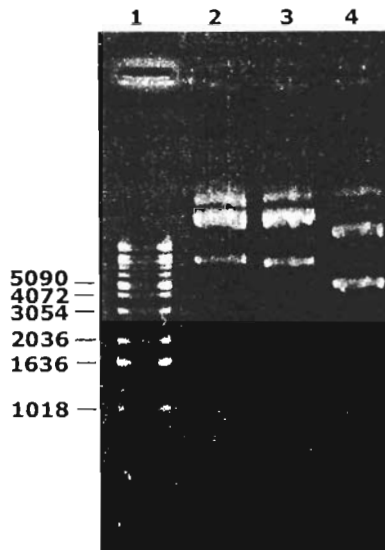
### **Colocalización**

Para realizar los análisis de colocalización, las imágenes capturadas se procesan con el programa Image-Pro Plus 4.0. Para esto se realizaron tomas en el mismo campo de las células transfectadas y teñidas con faloidina, posteriormente con el programa se realizó la sobreposición de las imágenes y la colocalización se observó al mezclar los colores rojo y verde, dando como resultado un color amarillo.



## Resultados

El ADN de los plásmidos (pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>r</sup>) utilizados para los experimentos de transfección fue obtenido por el método de CsCl como se describe en materiales y métodos. Se cuantificó por espectrofotometría UV a una densidad óptica (DO) de 260 nm, obteniendo como resultado una concentración de 6.64  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para pEGFP-Actin<sup>m</sup> y de 6.975  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para pEGFP-Actin<sup>r</sup> en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ . Se corrieron 200 ng de cada ADN en un gel de agarosa para evaluar su integridad comparando su patrón con el obtenido del plásmido original pEGFP-Actin (figura 5). En cada carril se observan tres bandas las cuales corresponden al ADN super-enrollado, enrollado y circular, así como el patrón esperado indicando la integridad del ADN obtenido por CsCl.

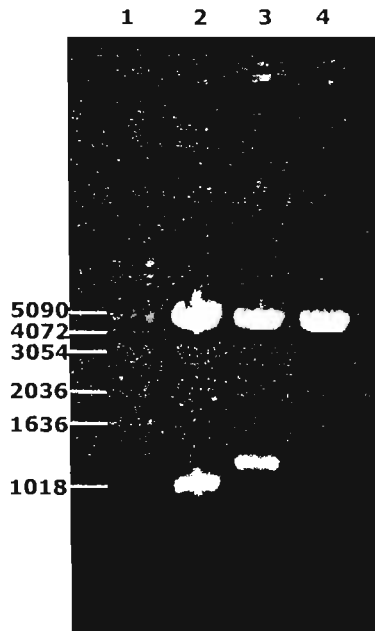


**Figura 5. ADN de plásmido de pEGFP-Actin<sup>m</sup>, pEGFP-Actin<sup>r</sup> y pEGFP-Actin.** Los ADN de pEGFP-Actin (2), pEGFP-Actin<sup>m</sup> (3) y pEGFP-Actin<sup>r</sup> (4) se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con EtBr. A la izquierda se corrió el marcador de peso molecular de 1 Kb (1).

Para verificar que los ADN obtenidos corresponden a los plásmidos pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin, determinamos el patrón de restricción de cada uno de ellos con



las enzimas *Bgl* II y *Bam*H I, para liberar el fragmento que codifica para  $\beta$ -actina. Como se muestra en la **Figura 6** se obtuvo un banda de 4687 pb en ambos casos correspondiente al vector pEGFP y una banda de 959 pb correspondiente a  $\beta$ -actina mutada (**carril 2**) y 1133 pb correspondiente a  $\beta$ -actina (**carril 3**). Para pEGFP-Actin se trató con *Bsa* I el cual tiene dos sitios de corte, uno dentro de la secuencia que codifica para  $\beta$ -actina en el nc 1718 y el otro sitio se encuentra en el nc 4834, por lo que solo se encontró un sitio de corte ya que no se encuentra el fragmento de  $\beta$ -actina linearizando al plásmido de 4687 pb. Ya que se obtuvo el patrón de restricción esperado nuestro resultado indica que nuestros ADNs son los correctos.



**Figura 6. Patrón de restricción de los plásmidos pEGFP-Actin<sup>m</sup>, pEGFP-Actin<sup>n</sup> y pEGFP-Actin<sup>f</sup>.** Digestión de pEGFP-Actin<sup>m</sup> (2), pEGFP-Actin (3) y pEGFP-Actin<sup>f</sup> (4). A la izquierda (1) se corrió el marcador de peso molecular de 1 kb.

## Transfección y expresión de actina fluorescente en células MDCK transfectadas

Células MDCK se transfectaron con los plásmidos pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>r</sup> por la técnica de co-precipitación con fosfato de calcio como se describe en materiales y métodos para expresar una  $\beta$ -actina truncada exógena y células control expresando únicamente la proteína fluorescente (EGFP). Se obtuvo una eficiencia de transfección del 20-30 %. Para obtener células transfectadas establemente, se realizaron dos selecciones con 600  $\mu$ g/ml de G418 (Geneticina). La primer selección se hizo 48 hrs post-transfección, donde se obtuvo una muerte celular de más de la mitad de la población, después de 10 días se le retiró la droga y se agregó medio sin droga durante 120 hrs. Posteriormente se realizó una segunda selección con la misma concentración de droga durante 15 días, la muerte celular disminuyó y las células mostraron una clara recuperación a partir del 11<sup>o</sup> día. Del total de células resistentes aproximadamente el 80% presentaban fluorescencia (**tabla 2**). La permanencia de la fluorescencia en las células en ausencia de la droga después de la segunda selección indicó la integración de los plásmidos al genoma de las células transfectadas.

**Tabla 2. Porcentaje de células fluorescentes y viabilidad durante la primera y segunda selección post-transfección**

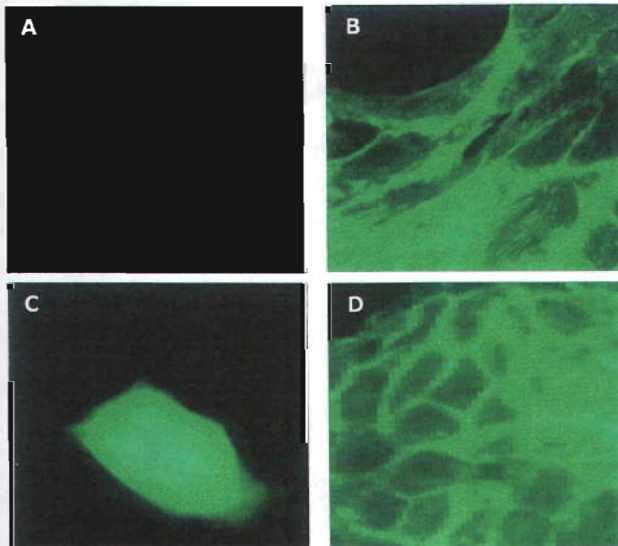
Días	% de células Fluorescentes		% de células muertas	
	EGFP-Actin <sup>m</sup> (Mut)	EGFP-Actin <sup>r</sup> (Mock)	EGFP-Actin <sup>m</sup> (Mut)	EGFP-Actin <sup>r</sup> (Mock)
<b>1er Selección</b>				
1 <sup>o</sup>	20	30	20	15
3 <sup>o</sup>	30	30	25	15
5 <sup>o</sup>	30	30	40	30
7 <sup>o</sup>	30	40	50	45
9 <sup>o</sup>	30	40	70	60
<b>2<sup>a</sup> Selección</b>				
1 <sup>o</sup>	30	60	20	10
3 <sup>o</sup>	30	60	20	10
5 <sup>o</sup>	30	60	20	20
7 <sup>o</sup>	50	60	30	20
9 <sup>o</sup>	50	70	30	30
11 <sup>o</sup>	70	70	30	20
13 <sup>o</sup>	70	80	20	10
15 <sup>o</sup>	80	80	10	5

A 24 hrs de haberse aplicado la droga G418, se evaluó el número aproximado de células fluorescentes y de células muertas en dos selecciones consecutivas. Los porcentajes son valores aproximados de observaciones en las cajas de cultivo durante los procesos de selección.



Las células transfectadas establemente se clonaron en un citómetro de flujo (FACS) obteniendo una eficiencia de clonación ~30% de las cuales se seleccionaron 8 clonas que mostraban la mayor fluorescencia para las células Mock y 6 para las células Mut. Se congelaron tanto poblaciones de segunda selección como clonas y se probó la eficiencia del proceso de congelación como se describe en materiales y métodos.

Para evaluar la expresión de EGFP (EGFP-Actin<sup>-</sup>) y la EGFP fusionada a actina mutada (EGFP-Actin<sup>m</sup>) de las transfectantes obtenidas en este trabajo; así como, EGFP fusionada a actina (EGFP-Actin) de una transfectante obtenida en un trabajo previo, las células fueron analizadas bajo el microscopio de fluorescencia con el objetivo 63X. Como se observa en la **figura 7** las células Mock (**panel C**) mostraron una fluorescencia homogénea en el citoplasma y núcleo de la célula. Por el contrario en las células A<sup>+</sup> la fluorescencia se observó en los microfilamentos y en el anillo cortical, los filamentos de actina se encuentran organizados y linearizados en un mismo sentido (**panel B**). En el caso de las células Mut (**panel D**) la fluorescencia también se observó en los microfilamentos y anillo cortical pero a diferencia de A<sup>+</sup> los filamentos de actina se observaron ordenados sin un patrón específico y aún cuando se permite la formación del anillo cortical éste no es tan distinguible como en el caso de A<sup>+</sup>. Las células WT (**panel A**) no muestran fluorescencia ya que no expresan EGFP.



**Figura 7. Expresión de la proteína verde fluorescente en células MDCK.** Células WT (A), transfectadas con pEGFP-Actin denominadas A<sup>+</sup> (B), células transfectadas con pEGFP-Actin<sup>-</sup> denominadas Mock (C) y transfectadas con pEGFP-Actin<sup>m</sup> denominadas Mut (D) fueron analizadas bajo el microscopio de fluorescencia con el objetivo 63X.

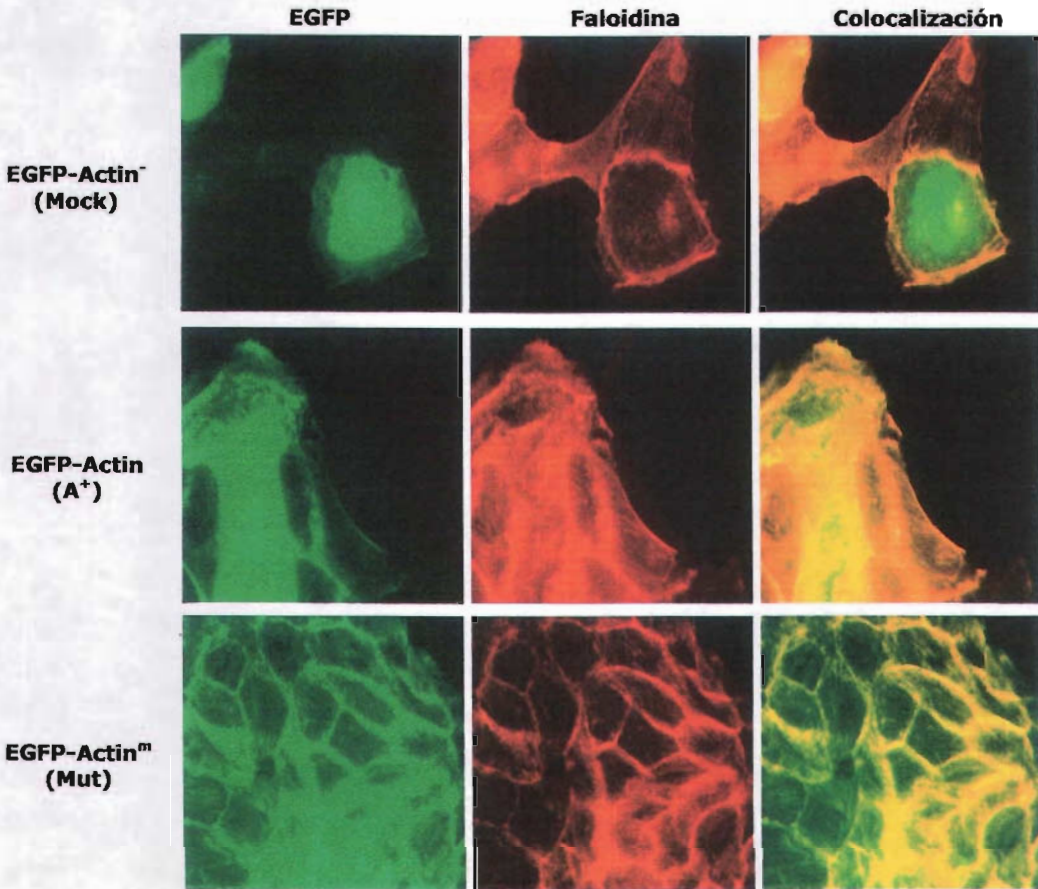


## Organización del citoesqueleto de actina en células transfectadas con pEGFP-Actin<sup>m</sup>, pEGFP-Actin<sup>r</sup> y pEGFP-Actin

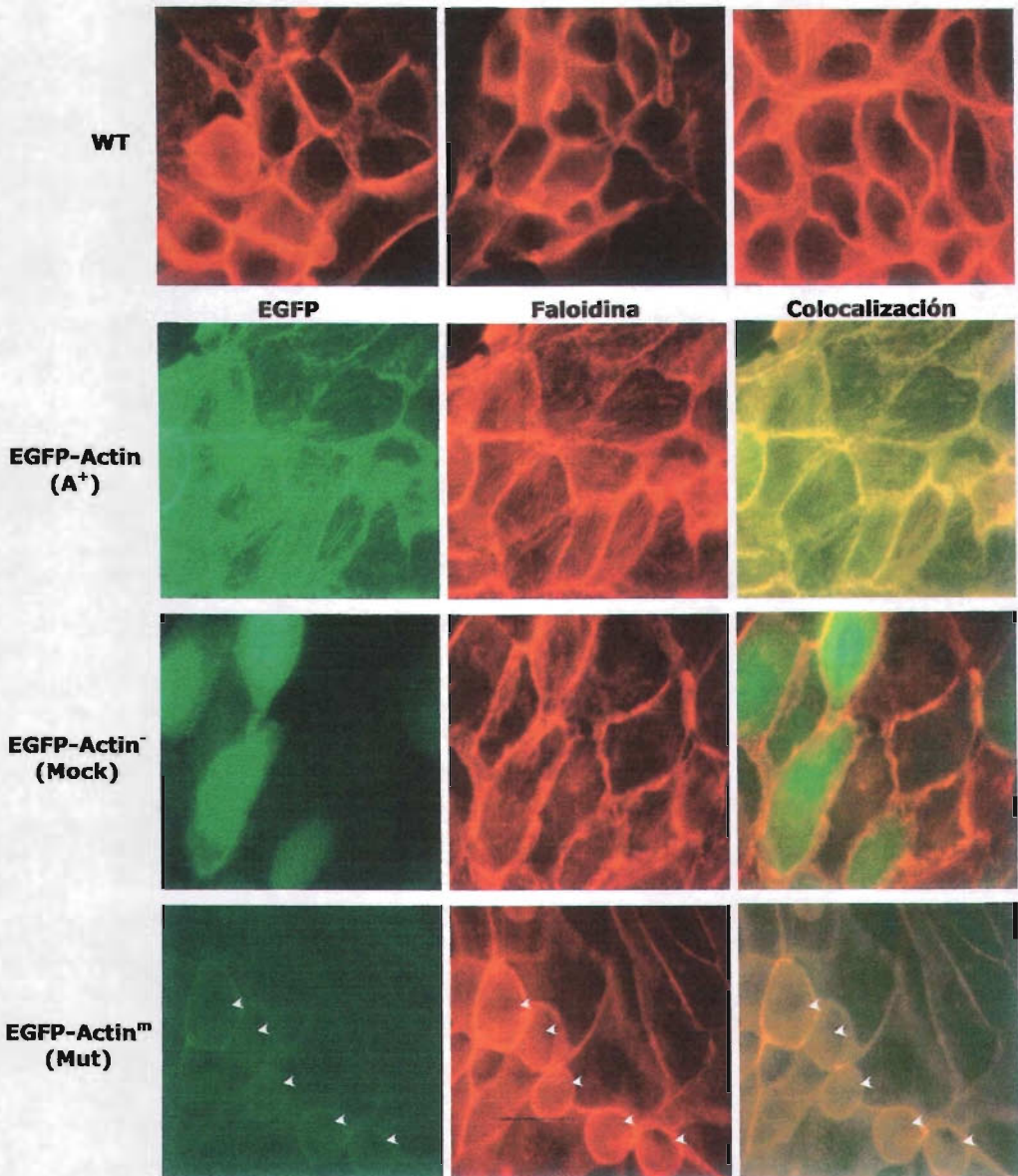
Para evaluar el efecto de la expresión de actina normal y mutada exógena en la organización del citoesqueleto de actina, células MDCK transfectadas en subconfluencia y confluencia se tiñeron con faloidina rodaminada como se describe en materiales y métodos. Como se muestra en la **figura 8** la expresión tanto de actina normal como mutada exógena (verde) colocalizan con la actina endógena (rojo), evidenciado por el color amarillo obtenido de la superposición de la tinción con faloidina rodaminada y la expresión de la EGFP. Como se mostró anteriormente la expresión de la proteína verde fluorescente en las células Mock se distribuye en núcleo y citoplasma, por lo que como se esperaba no colocaliza con los filamentos de actina endógena. Aún cuando se observa una colocalización en el área cortical de la célula consideramos que posiblemente es resultado de la presencia de la EGFP en la membrana de la célula en donde se concentra una alta cantidad de actina. Para poder confirmar lo dicho sería necesario realizar análisis por microscopía confocal en cortes seriados.

Para monitorear el comportamiento de las células en cultivo, éstas eran observadas en el microscopio de fluorescencia a lo largo de diferentes resiembras. La expresión de la EGFP en las células Mock no presentó ninguna alteración en su morfología ni en el crecimiento de las células al igual que cuando se expresó EGFP-actina (A<sup>+</sup>) indicando que la expresión de EGFP es inocua y que la expresión de  $\beta$ -actina exógena no tuvo un efecto deletéreo en las células transfectadas. Por otro lado en el caso de células transfectadas con EGFP-actina<sup>m</sup> se observó una morfología alterada mostrando células redondeadas que no se extendían tan ampliamente como las células control (WT y Mock) y células expresando EGFP-actina tanto en subconfluencia (**figura 8**) como en confluencia (**figura 9 y 10**). También las células expresando EGFP-actina<sup>m</sup> se caracterizaron por un crecimiento más lento que las células control (**tabla 3**). Estudios posteriores serán necesarios para determinar si el crecimiento lento es resultado de un cambio en su tasa de crecimiento o de una fase lag prolongada. Además, las células Mut siempre presentaron niveles de fluorescencia menores.



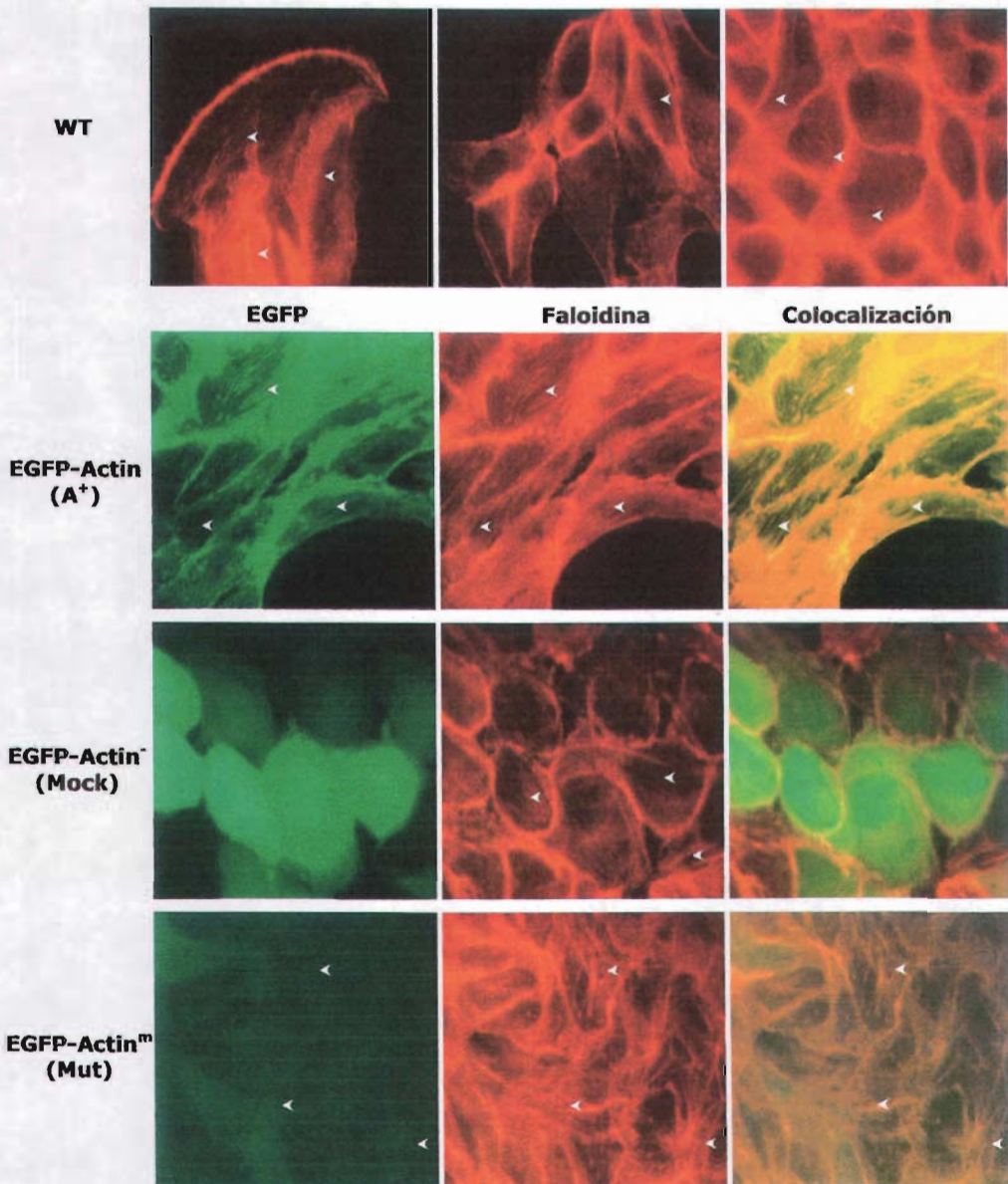


**Figura 8. Distribución de los filamentos de actina en células MDCK transfectadas con pEGFP-Actin<sup>-</sup>, pEGFP-Actin y pEGFP-Actin<sup>m</sup>.** Se muestra la distribución de los filamentos de actina exógena (verde) con respecto a la endógena (rojo) y su colocalización (amarillo) de células transfectadas a diferentes grados de subconfluencia. En las células Mock la EGFP se acumula en citoplasma y núcleo. En células A<sup>+</sup> y Mut puede observarse una colocalización de actina endógena y exógena del 90-95% y del 95-100%, respectivamente. La actina exógena forma parte de las estructuras del citoesqueleto como los filamentos de actina, fibras de estrés y anillo de actina cortical.



**Figura 9. Alteración morfológica de células Mut con respecto a células control Mock, A<sup>+</sup> y WT.** Las células Mut muestran unas formas redondeadas (señalado con la cabeza de flecha), indicando que la organización del citoesqueleto de actina es diferente a las células control Mock, A<sup>+</sup> que presentan una morfología muy similar a células WT que tiene la morfología normal de la célula.





**Figura 10. Organización de filamentos de actina en células MDCK Mut con respecto a los controles WT, A<sup>+</sup> y Mock.** En células Mut hay una completa desorganización de actina exógena y endógena (indicado con la cabeza de flecha). Las A<sup>+</sup> presentan una mejor organización y distribución de filamentos (cabeza de flecha). La Mock y WT solo presentan la organización de actina endógena formando parte de los filamentos, fibras de estrés, microvellosidades y del anillo cortical (cabeza de flecha).

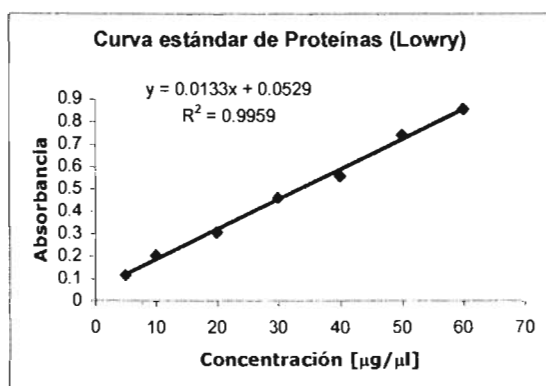
Tabla 3. Comportamiento celular en cultivo

	WT	A <sup>+</sup>	Mock	Mut
<b>Expresión de la EGFP</b>	No presenta	Normal	Alta	Baja
<b>Crecimiento en cultivo</b>	Normal	Normal	Normal	Baja
<b>Morfología</b>	Normal	Normal	Normal	Alterada

Las células A<sup>+</sup> y Mock se comportan de forma similar a las células WT. La Mut presenta variaciones muy notorias en la morfología, expresión de EGFP y el crecimiento en cultivo.

### Niveles de expresión de la proteína de $\beta$ -actina endógena y exógena en células MDCK transfectadas con pEGFP-Actin y pEGFP-Actin<sup>m</sup>.

Para evaluar de qué manera afecta los niveles de la proteína endógena la expresión de  $\beta$ -actina exógena normal y mutada se realizaron ensayos de inmunotransferencia (*Western Blot*). Primero se cuantificó la concentración de proteína de los extractos por el método de Lowry como se describe en materiales y métodos. En la **figura 11** se presenta la curva estándar obtenida y la ecuación de la curva con la que se calculó la concentración de los extractos totales de proteínas.



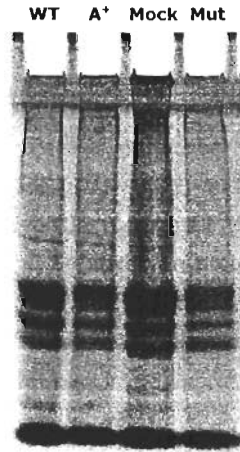
**Figura 11. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.** La curva estándar obtenida muestra un coeficiente de regresión lineal  $R^2 = 0.9959$  que indica que los datos obtenidos son 99% confiables, con la ecuación de la curva obtenida se pudo calcular la concentración de proteínas de los extractos totales obtenidos.



Los resultados obtenidos fueron:

Células	Absorbancia [Proteína]	
	750 nm	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
WT	0.5975	40.9473
A+	0.6025	41.3233
Mock	0.6793	47.0977
Mut	0.4877	32.6917

Para evaluar la integridad de las proteínas y descartar su probable degradación debido a la manipulación durante la extracción y la cuantificación se corrieron las muestras en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 10% como se describe en materiales y métodos. Como se muestra en la **figura 12** los extractos proteicos mostraron el patrón de corrimiento esperado. Se observan proteínas de alto peso molecular lo que indica que no hubo degradación, además todas las muestras presentan el mismo patrón indicando que la expresión de EGFP así como de la actina normal y mutada fusionada a EGFP no modificó el patrón de expresión de las células transfectadas con respecto a las células WT.



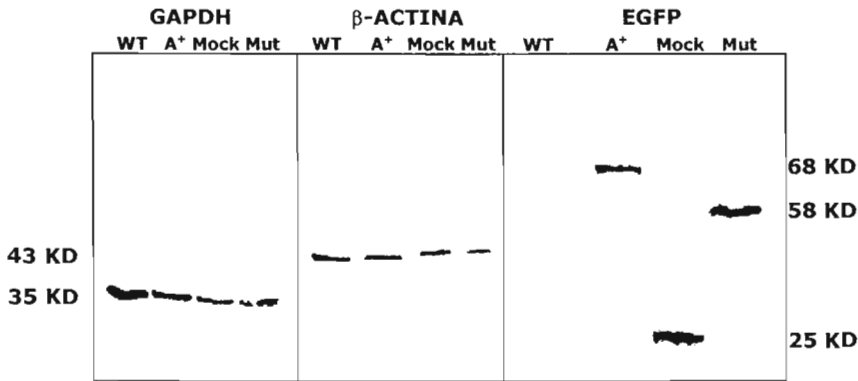
**Figura 12. Extracto total de proteínas de las células WT y transfectadas.** Extractos totales de proteínas de células silvestres (WT), transfectadas con pEGFP-Actin (A<sup>+</sup>), pEGFP-Actin<sup>Mock</sup> (Mock) y pEGFP-Actin<sup>Mut</sup> (Mut) se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul Coomassie.

Iguales concentraciones de proteína (3 mg) cuantificada por Lowry y en gel se utilizaron para realizar los ensayos por *Western Blot*. Las inmunotransferencias se interaccionaron con un primer anticuerpo anti  $\beta$ -actina, para detectar la  $\beta$ -actina



endógena; anticuerpo anti EGFP, para detectar la EGFP fusionada a la  $\beta$ -actina exógena; y anticuerpo anti GAPDH (gliceraldehído) como control de carga. El primer anticuerpo fue detectado y revelado usando un segundo anticuerpo peroxidado anti-ratón, como se muestra en la **figura 13**.

Los resultados mostraron bandas de diferentes pesos moleculares correspondientes al peso molecular esperado de cada muestra: 35 kD para GAPDH, 43kD para actina endógena, 25 kD para EGFP, 58 kD para EGFP fusionada a actina truncada, 68kD para EGFP fusionada a actina. El anticuerpo anti-actina únicamente reconoce a la actina endógena por lo que únicamente obtuvimos la banda de 43 kD.



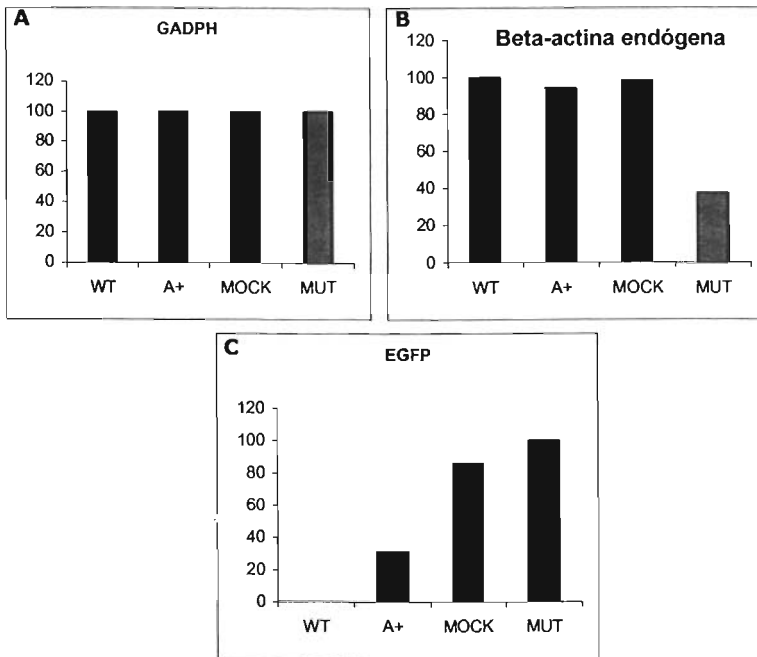
**Figura 13. Inmunotransferencia de  $\beta$ -actina endógena y exógena en células WT y transfectadas.** Extractos proteicos de células WT y transfectadas fueron analizados por inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos para evaluar los niveles de actina endógena y exógena. Un anticuerpo anti-GAPDH se utilizó para evaluar los niveles de una proteína constitutiva para ser usada como control de carga.

Las inmunotransferencias anteriores fueron analizadas por densitometría para determinar los valores relativos de  $\beta$ -actina endógena y exógena en las células transfectadas (A<sup>+</sup> y Mut) con respecto a las células control (WT y Mock) (**figura 14**). Para ello se utilizó el programa de computo SigmaGel versión 1.0. Los valores fueron normalizados con respecto a GAPDH (**panel A**) como control de carga de la misma cantidad de muestra y con respecto a la muestra con mayor intensidad de banda (considerada como 100%) para cada grupo de  $\beta$ -actina y GFP. Como puede observarse hay un claro incremento del 31 y 100% de  $\beta$ -actina exógena normal y mutada respectivamente (**panel C**). Este incremento tuvo un impacto en los niveles de  $\beta$ -actina endógena en células expresando actina mutada (**panel B**) en donde una





disminución de 63% fue observada. Contrario a lo esperado en A<sup>+</sup> únicamente una reducción de 6% en los niveles de actina endógena fue obtenida. Como se esperaba los niveles de actina endógena no se modificaron en las células Mock en donde únicamente la proteína EGFP esta expresada.

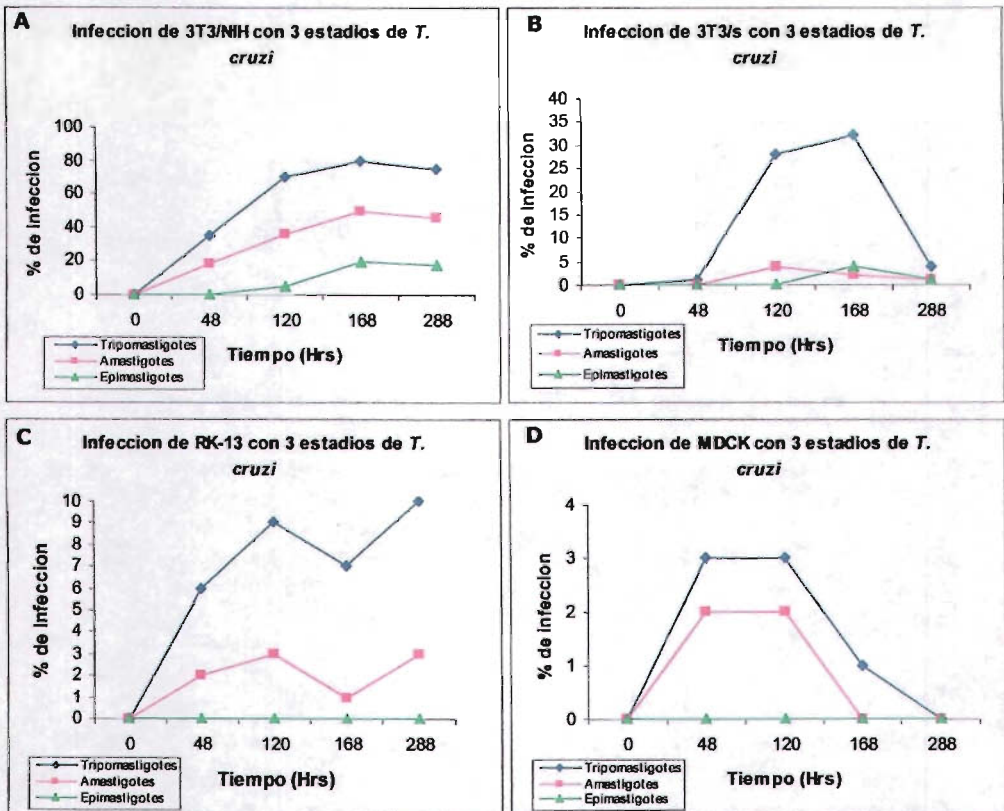


**Figura 14. Expresión de  $\beta$ -actina endógena y exógena.** Análisis densitométrico de la expresión de  $\beta$ -actina endógena y exógena de la inmunotransferencia de la figura 9. (A) Control de carga de GAPDH normalizado a 100% y utilizado para normalizar los valores con respecto al control de carga. (B) Niveles de  $\beta$ -actina endógena normalizados con respecto a la WT. (C) Niveles de EGFP fusionada a  $\beta$ -actina exógena normalizados a los valores obtenidos a Mut.



### Cinética de infección de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi* en dos líneas de células epiteliales (MDCK y RK13) y dos líneas de fibroblastos 3T3 (S y NIH)

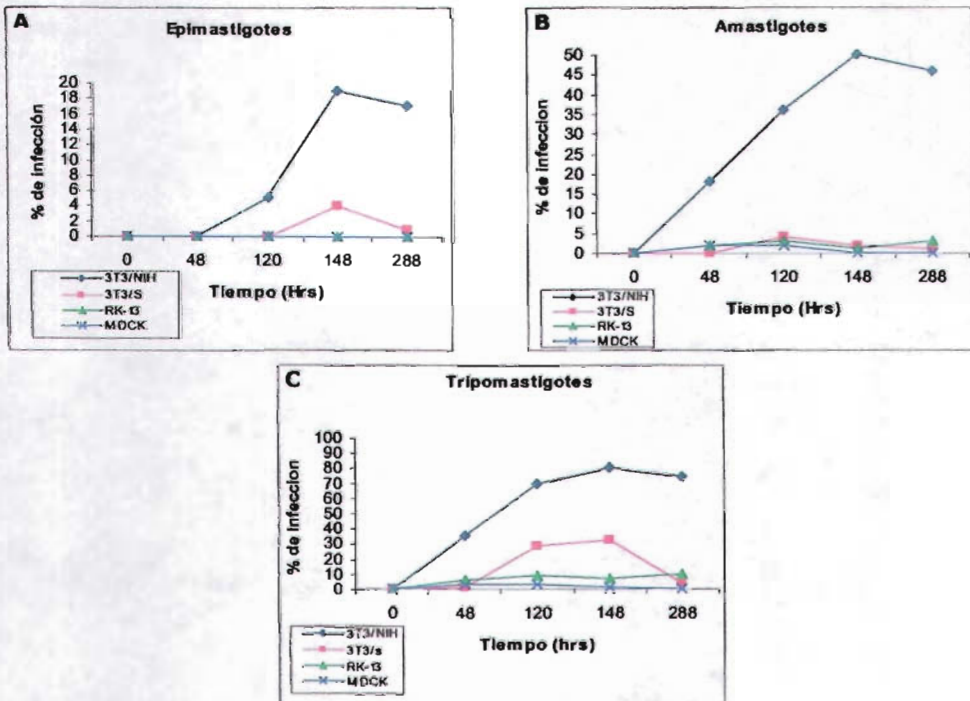
Debido a que se ha reportado que la infección de tripomastigotes en células epiteliales es influenciada por la polaridad celular (Schenkman y cols, 1988; Tardieux y cols, 1992; Gottlieb y cols, 1993), se realizó un ensayo de infección con los tres estadios del parásito *T. cruzi* en dos líneas de células epiteliales (MDCK y RK13) y se compararon con fibroblastos 3T3 (NIH y S) en los que se ha reportado que la invasión



**Figura 15. Cinética de infección en fibroblastos 3T3 (NIH y S) y epitelios (MDCK y RK13).** Se llevó a cabo una cinética de infección en cuatro líneas celulares con los tres estadios de desarrollo del parásito. (A) Fibroblastos 3T3 NIH; (B) fibroblastos 3T3 S; (C) epitelios RK13; (D) epitelios MDCK.



se puede dar por cualquier parte de la superficie de la célula (Schenkman y cols, 1988). Los resultados se muestran en la **figura 15**, en donde se puede ver un mayor índice de infección en fibroblastos que en células epiteliales con los tres estadios de desarrollo del parásito. Mientras que los epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes presentaron un porcentaje de infección de 0%, 3-9% y 2% en células epiteliales (MDCK y RK13 respectivamente) en fibroblastos mostraron índices de 5-10%, 30-70% y 5-40% (S y NIH respectivamente). En la **figura 16** se muestra la cinética de infección por estadio de parásito, en todos los casos los fibroblastos 3T3 (S y NIH) presentan mayor porcentaje de células infectadas (4-20, 4-50 y 32-70% con epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes, respectivamente) comparado con las células epiteliales MDCK y RK13 (0, 2-3 y 3-10% con epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes, respectivamente). También, observamos que el estadio de tripomastigote es el más infectivo independientemente del tipo celular utilizado, seguido por los amastigotes y estos a su vez por epimastigotes, siendo incluso estos últimos, no infectivos en las células epiteliales.



**Figura 16. Cinética de infección con epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes en cuatro líneas celulares.** Se llevó a cabo una cinética de infección con los tres estadios de desarrollo del parásito en fibroblastos 3T3 (NIH y S) y células epiteliales (RK13 y MDCK). (A) epimastigotes; (B) amastigotes; (C) tripomastigotes.

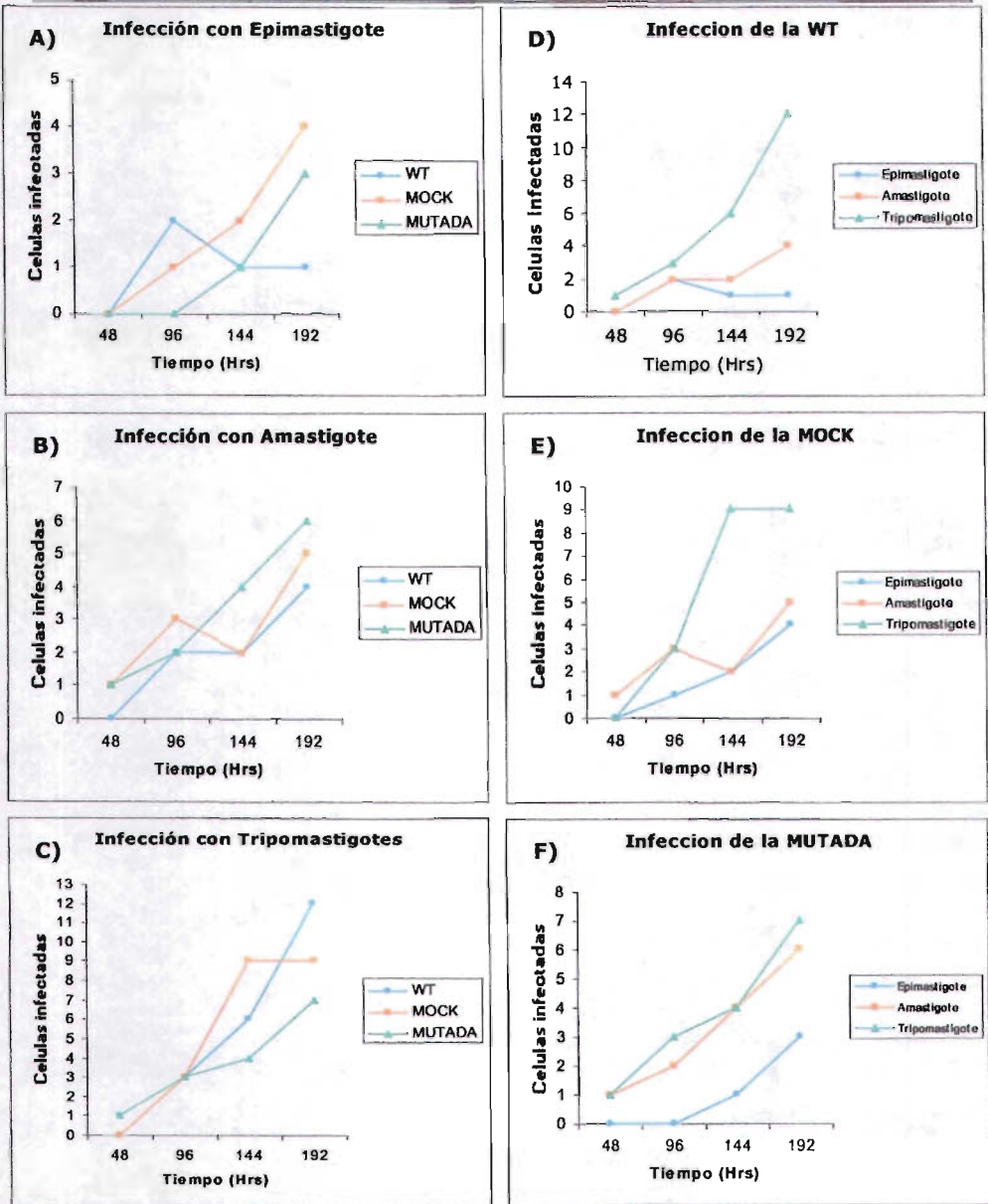


## Cinética de infección de células MDCK con los diferentes estadios de desarrollo de *Trypanosoma cruzi*

Ya que uno de los objetivos de este trabajo es el de dilucidar si el citoesqueleto de actina tiene alguna participación en el proceso de infección por *Trypanosoma cruzi*, para lograr nuestro objetivo se hizo un ensayo de infección con células MDCK WT, expresando EGFP (Mock) y expresando  $\beta$ -actina mutada fusionada a EGFP (Mut).

Los parásitos que se usaron para la infección fueron extraídos de una infección primaria realizada en células NIH 3T3, cepa en la que se obtiene el mejor rendimiento de tripomastigotes y amastigotes. En un trabajo previo se obtuvieron parásitos *knock-in* expresando la proteína EGFP los cuales fueron utilizados en este trabajo. Se inocularon  $1 \times 10^5$  parásitos fluorescentes de cada estadio a células al 40% de confluencia durante 48 hrs, se lavaron exhaustivamente y se determinaron el número de células infectadas a las 48, 96, 144 y 192 hrs. Los resultados se muestran en la **figura 17** en donde se puede observar que las infecciones con amastigotes tienen un mayor índice de infección en las células Mut comparado con las células control (WT y Mock). Por otro lado en tripomastigotes y epimastigote la infección disminuye en células expresando actina mutada. Además, cuando comparamos la infección con los tres estadios de desarrollo del parásito en células WT, Mock y Mut, los tripomastigotes infectan más que los amastigotes y estos a su vez más que los epimastigotes como se observó en el experimento anterior (**figura 16**). Estos resultados sugieren que los amastigotes utilizan un mecanismo independiente de actina para infectar células epiteliales, mientras que los tripomastigotes y epimastigotes utilizan un mecanismo dependiente de microfilamentos. Nuestros resultados por el momento son preliminares por lo que serán necesarios estudios futuros para comprobar esto.





**Figura 17. Cinética de infección de epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes en células MDCK.** Se realizaron cinéticas de infección con los tres estadios de desarrollo del parásito: epimastigote (A), amastigote (B) y tripomastigote (C). Los mismos resultados fueron analizados con respecto a las células hospederas usadas: WT (D), Mock (E) y Mut (F).



## Discusión

La gran cantidad de descubrimientos tecnológicos que han permitido la manipulación del ADN y los sorprendentes adelantos de la biología molecular y celular basados en el análisis y la manipulación de macromoléculas, en especial del ADN, se debe en gran parte al descubrimiento de diversas enzimas que por un lado cortan el ADN (enzimas de restricción) de cualquier organismo en secuencias específicas de nucleótidos (nc) y por el otro que ligan fragmentos con extremos compatibles (ADN ligasas) en vectores de transfección para producir ADN recombinante permitiendo así su replicación y expresión. Estas moléculas de ADN recombinante pueden introducirse dentro de células blanco por el método de transfección y tener así diferentes aplicaciones. Existen una gran variedad de técnicas de transfección a elegir dependiendo de cada tipo y línea celular. La técnica más utilizada en células eucariotas es la precipitación de ADN por fosfato de calcio (Ca-Pi), ya que no requiere de equipos especiales y costosos, además de que la eficiencia de transfección es muy buena, sin importar la concentración utilizada. Jordan y colaboradores en 1996, sugieren que se use una concentración de ADN entre 25-50  $\mu\text{g/ml}$ , pero se ha demostrado que la concentración no tiene efecto sobre la calidad de la transfección, ya que esta se basa principalmente en la cantidad y calidad de los precipitados finos entre el  $\text{CaCl}_2$  y el ADN en una solución salina de fosfatos que permiten una mayor probabilidad de ser incorporados por la célula. Ejemplo de esto, son los trabajos de Rupprecht y colaboradores en 1991, utilizó 20  $\mu\text{g/ml}$  del ADN obteniendo una buena transfección, mientras que Batard y colaboradores en 2001 uso concentraciones de 2.5  $\mu\text{g/ml}$  del ADN de plásmido. También se han utilizado concentraciones mayores como las que usó Ponce en 1998, para transfectar células MDCK que utilizó 100  $\mu\text{g/ml}$  del ADN recombinante obteniendo una eficiencia del 30-40 %. Nosotros utilizando la misma línea celular usamos 2.5  $\mu\text{g/ml}$  de ADN recombinante obteniendo la misma eficiencia de transfección (30-40 %) con resultados favorables para una transfección estable con el plásmido pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>r</sup>.

Debido a que la línea celular (MDCK) utilizada para la transfección son epitelios, el uso de la técnica de transfección por Ca-Pi nos da una enorme ventaja ya que el uso de esta técnica no provoca alteraciones que afecten sus funciones esenciales, en 1996 Kaji y colaboradores evaluaron las propiedades en el transporte iónico de las células MDCK al introducir ADN exógeno por medio de la técnica de lipofectina, encontrando



que el proceso de transfección por sí solo altera las funciones de transporte de las células epiteliales en cuanto al número de moléculas de transporte en la superficie de la célula.

Los vectores de transfección utilizados en este trabajo fueron pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>r</sup> que derivan del plásmido original pEGFP-Actin (Clontech Laboratories Inc.) de 5820 pb, al que en un trabajo previo en nuestro laboratorio se suprimieron 174 nc internos usando la enzima de restricción *Xcm* I (enzima de restricción con dos sitios de corte en el vector pEGFP-Actin), cortando del nc 1879 al nc 2053 de la secuencia que codifica para  $\beta$ -actina de humano (ver apéndice), quedando un vector de 5646 pb al ligar nuevamente el vector sin el fragmento de 174 nc. Para obtener el vector pEGFP-Actin<sup>r</sup> se hizo una doble digestión del vector original (pEGFP-Actin) con *Bgl* II y *Bam*H I para eliminar la secuencia completa que codifica para la  $\beta$ -actina de humano (ver apéndice), quedando un vector de 4687 pb al religar éste ya que *Bgl* II y *Bam*H I son extremos cohesivos para ambas enzimas. En la **figura 6** se muestra el resultado de una doble digestión con *Bgl* II y *Bam*H I, las cuales tienen un solo sitio de corte, en el nc 1340 y 2480, respectivamente (ver apéndice). Por esta razón se observan dos bandas de diferente tamaño para los vectores pEGFP-Actin (5820) y pEGFP-Actin<sup>m</sup> (5646 pb), una de 1133 pb o 959 pb que corresponde a la secuencia completa de  $\beta$ -actina de humano o  $\beta$ -actina truncada (-174 nc) respectivamente y otra de 4687 correspondiente al resto de la secuencia del vector. En el caso de pEGFP-Actin<sup>r</sup> sólo presenta una sola banda de 4687 pb debido a que este fragmento no tiene la secuencia de actina por lo tanto sólo vemos el vector linearizado con *Bsa* I que tiene dos sitios de corte, una dentro del fragmento de actina (ausente) y la otra en el nc 4834.

Los vectores usados para transfectar células MDCK contienen en su ADN una secuencia que codifica para resistencia a Neomicina, cuya expresión nos va ser de gran utilidad para seleccionar únicamente células que hayan integrado en su genoma el ADN transferido por Ca-Pi utilizando la droga G418 (Geneticina), aquellas células en cultivo que sobrevivan a la presencia de 600  $\mu$ g/ml de esta droga son células transfectantes estables, de este modo se mide la eficiencia de la transfección. Nosotros realizamos dos selecciones; la primera duró 9 días en la cual hubo un 60-70% de muerte celular, por lo que la eficiencia de transfección fue de aproximadamente 30-40 %, sin embargo en estas condiciones también pueden sobrevivir células que tengan el ADN transfectado extracromosomalmente por lo que las células se crecieron por unos días



en ausencia de la droga para que aquellas con el ADN extracromosomal lo eliminaran y entonces se sometieron a una segunda selección que duró 15 días en donde la muerte celular fue menor del 20-30% y después del 11° día las células sobrevivientes en cultivo en presencia de la G418 comenzaron a expandirse mostrando signos de resistencia a la droga, al finalizar los 15 días de selección sólo el 80% de las células resistentes a G418 expresaban a la EGFP. Este mismo efecto observó Choidas y colaboradores en 1998 planteó la posibilidad de alguna delección en la secuencia del plásmido y al momento de expresar la proteína disminuye o nulifica completamente su fluorescencia, nosotros creemos que el comportamiento de las MDCK resistentes a la droga pero no fluorescentes (20 %) obedece más a que la inserción del ADN del vector se dió azarosamente dentro del cromosoma de las células y por tanto la expresión de la EGFP está no solo bajo la regulación del promotor del Citomegalovirus (CMV) sino también de las secuencias flanqueantes endógenas que podrían modificar su expresión. Para resolver el problema de una expresión de fluorescencia no homogénea realizamos una clonación en un citómetro de flujo (FACS) marca ADVANTIX, seleccionando aquellas clonas con mayor grado la fluorescencia. Como se muestra en la **figura 7** una expresión homogénea de fluorescencia en las clonas de células transfectadas con pEGFP-Actin, pEGFP-Actin<sup>-</sup> y pEGFP-Actin<sup>m</sup> fue observada, demostrando que el ADN transferido fue integrado y expresado por éstas células.

El uso de proteínas del citoesqueleto, como actina, fusionadas a la proteína verde fluorescente (EGFP-actina) es ampliamente utilizada como una herramienta molecular para monitorear el comportamiento del citoesqueleto de actina en distintos tipos de células, como B16F1, fibroblastos 3T3, células CHO, COS-7 y t-End, NIH3T3, NBT II, COS-7, PC-12 y células HeLa (Ballestrem y cols, 1998; Choidas y cols, 1998), demostrando que esta proteína se encuentra presente en las fibras de estrés, adhesiones focales y formando parte del anillo cortical además de encontrarse una parte diseminada en el citoplasma que corresponde a la actina globular. En la **figura 8** puede observarse el mismo fenómeno e incluso se pueden observar también sobre las microvellosidades, como lo observado en células epiteliales LLC-PK, en donde la proteína verde fluorescente unida a actina forma las mismas estructuras del citoesqueleto de actina endógena incluyendo las microvellosidades (Herget-Rosenthal y cols, 2001). En estos mismos resultados podemos ver como al transfectar la EGFP sin la fusión a actina, se presenta en toda la célula, debido a que se distribuye por todo el citoplasma y el núcleo de la célula y no sólo en microfilamentos como las que tienen la fusión a actina.





Ya que el citoesqueleto es determinante para mantener la morfología celular determinamos si al transfectar células MDCK con pEGFP-Actin<sup>m</sup>, tuvo alguna incidencia sobre la morfología celular. Los resultados que se presentan en la **tabla 3** y en la **figura 9** demuestran que sí hay cambios en la morfología de las células transfectadas con pEGFP-Actin<sup>m</sup> lo cual creemos que se debe a que la  $\beta$ -actina mutada se intercala con  $\beta$ -actina endógena perturbando la organización y función de los filamentos, esta hipótesis fue demostrada con la **figura 10**, en donde se ve una desorganización de los filamentos compuestos tanto de actina exógena como de actina endógena. También suponemos que hay debilitamiento de las uniones al sustrato y a otras células que creemos es el resultado de que se apagan vías de señalización que activan factores de transcripción de genes involucrados en la proliferación celular y se ve reflejado en la cinética de crecimiento que es distinta a la de las células control WT y transfectadas con pEGFP-Actin y pEGFP-Actin<sup>m</sup>. En 1987, Leavitt y colaboradores, obtuvieron por transformación neoplásica, fibroblastos KD humanos que expresan una  $\beta$ -actina exógena que contiene una mutación puntual (gly-244→Asp-244) y observaron que dichas células presentaban alteraciones morfológicas en mayor o menor grado dependiendo del nivel de expresión de  $\beta$ -actina mutada, estas alteraciones consistían en que la células se redondeaban y después de un tiempo se despegaban del sustrato. Nosotros observamos en las células Mut un fenómeno muy similar cuando el cultivo celular llegaba al ~80% de confluencia, por lo que creemos que nuestras células seguían un comportamiento parecido al reportado por Leavitt. Este mismo autor describe que las alteraciones morfológicas en células transfectadas con pEGFP-Actin<sup>m</sup> no depende de la sobreexpresión de  $\beta$ -actina exógena mutada, sino, que obedece más a que la  $\beta$ -actina mutada se polimeriza con mayor rapidez que la  $\beta$ -actina endógena, formando filamentos que se unen para formar fibras de estrés defectuosas por la mutación y no cumplen con su papel en la arquitectura celular. Otras observaciones que se realizaron en ese mismo reporte es que la síntesis de  $\beta$ -actina endógenas disminuye en respuesta a la elevada expresión de la  $\beta$ -actina exógena, sugiriendo que la primera se autorregula al incrementarse las concentraciones de  $\beta$ -actina exógena.

Nosotros obtuvimos resultados muy similares con las células MDCK, utilizamos la técnica de inmunotransferencia para determinar los niveles de expresión de  $\beta$ -actina exógena con respecto a la  $\beta$ -actina endógena, utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas. También utilizamos como control de carga a la proteína de expresión constitutiva gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. En la **figura 14 panel B** se muestra que la expresión de  $\beta$ -actina endógena en las células Mut disminuyó,



debido aparentemente a la sobreexpresión de actina mutada exógena (**figura 14 panel C**). En el caso de las células que expresan  $\beta$ -actina exógena no observamos el mismo comportamiento, los niveles de actina endógena disminuyen aproximadamente 20 % debido a que la expresión de actina exógena aumentan en aproximadamente 30 %, la células se autorregulan para mantener los niveles de actina. En cuanto a la expresión de la Mock en la **figura 14 panel B** puede verse que se expresa por arriba de  $A^+$ . En este punto es importante recordar que la Mock no contiene el fragmento que codifica para  $\beta$ -actina completa exógena, pero si para la EGFP y es contra quien se une el anticuerpo que da la señal. Esto lo podemos constatar con la **figura 13** en la inmunotransferencia para la EGFP mostrando una banda de 25 kD que corresponde al peso molecular de la EGFP. En la misma figura se puede ver que para  $A^+$  y Mut también hay una banda de 68 y 58 kD, respectivamente, en WT como se esperaba no se detecta una banda ya que no expresa la EGFP ni actina exógena.

El objetivo general del laboratorio en donde fue realizada esta tesis es dilucidar el mecanismo por el cual *Trypanosoma cruzi* infecta a la célula hospedera. Al haber obtenido una mutante dominante negativa de  $\beta$ -actina podemos contar con una herramienta molecular que servirá para determinar el papel de actina de la célula huésped durante el proceso de infección por dicho parásito.

Es importante conocer el comportamiento de las células MDCK frente a la infección con epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, debido a que existen reportes que sugieren que la invasión de parásitos en células epiteliales a diferencia de fibroblastos está influenciado por la polaridad celular (Tardieux y cols, 1992). Los resultados de la **figura 15** muestran que el mayor porcentaje de células infectadas corresponde a los fibroblastos posiblemente como resultado de que éstos presentan diversos sitios de penetración del parásito (Schenkman y cols, 1988) o a una diferencia en la susceptibilidad de las líneas a la infección. Por otro lado no existen reportes comparativos en los que se determinen los niveles de infección con *T. cruzi* en diversas líneas celulares como fibroblastos 3T3 (NIH y S) y epitelios (MDCK y RK13) y en los cuales se resalte una cinética de infección completa para cada línea celular. Nosotros hemos demostrado que la infección de células MDCK es de aproximadamente 30 % con tripomastigotes que es el estadio con mayor capacidad infectiva para esta línea celular **figura 16**.

Para evaluar el papel del citoesqueleto de actina de la célula huésped durante el proceso de infección de *T. cruzi* realizamos cinéticas de infección para tasar en que



proporción con respecto a las células control (WT y Mock) se infectan las células con un citoesqueleto de actina alterado. En la **figura 17** se muestra que la infección con epimastigotes y tripomastigotes disminuye en las células Mut comparado con la infección obtenida en las células control (WT y Mock). Estos resultados son contradictorios a los obtenidos por Tardieux y colaboradores en 1992 que al tratar células MDCK con citocalacina D (CD) observaron que la infección con tripomastigotes era mayor cuando el citoesqueleto de actina se encontraba desorganizado. Gotlieb y colaboradores en 1993 mostraron que el tratamiento de células MDCK con CD, inhibe selectivamente la capacidad de las células para llevar a cabo endocitosis en la superficie apical sin afectar la endocitosis en el dominio basolateral. Considerando lo anterior, ya que la infección de tripomastigotes en células MDCK se lleva únicamente por el dominio basolateral (Schenkman y cols, 1988), pone en duda los resultados obtenidos por Tardieux y colaboradores en 1992 si es que un mecanismo por endocitosis es el predominante durante la invasión por este parásito. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten sugerir que el mecanismo de infección de epimastigotes y tripomastigotes en células MDCK es dependiente de microfilamentos. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que pueda existir otro u otros mecanismos en donde el parásito no requiera de la participación de filamentos de actina. Recientemente en el 2004 Woolsey y Burleigh, reportaron que la invasión de *Trypanosoma cruzi* se lleva a cabo por dos mecanismos de infección: uno dependiente y el otro independiente de lisosomas, además encuentran que el primero es dependiente de actina mientras que el segundo es independiente de microfilamentos.

Originalmente se había postulado que los microfilamentos de actina cortical podrían actuar como una barrera para la fusión de lisosomas a la membrana plasmática y que la transiente despolimerización de actina permite el acceso a la membrana plasmática a los lisosomas aumentando la entrada de *T. cruzi*. Al tratar células con citocalacina D se inhibe la asociación temprana de lisosomas con tripomastigotes de *T. cruzi* que durante la penetración celular desacoplan el empleo y/o fusión de lisosomas.

Por otro lado, la infección con amastigotes (**figura 17**) muestra un incremento en los índices de infección en células que expresan actina mutada comparado con las células WT y Mock, sugiriendo que el proceso infectivo de amastigotes es independiente de actina. Procopio y colaboradores en 1998 reportan que la invasión de los amastigotes fue inhibida por la disrupción de los microfilamentos y microtúbulos,



sugiriendo que el mecanismo de infección de los amastigotes es dependiente de microfilamentos. Se ha sugerido también que los amastigotes son internados de la periferia celular con una acumulación de actina que representa una barrera física para la llegada de lisosomas al sitio de unión del parásito (Procopio y cols, 1998). Por lo que al desorganizar los filamentos de actina por efecto de la mutación pudiera llevarse a cabo el transporte de lisosomas a la membrana celular y así internalizar al parásito.

En la misma **figura 17 panel C, D y E** se muestra que el estadio de tripomastigote es el más infectivo en las células MDCK, esto podría ser debido a que es el estadio más móvil por lo que se ha sugerido que podrían tener un papel mecánico activo en la invasión, no requiriendo de un citoesqueleto intacto de la célula huésped (Schenkman y Mortara, 1992).

Los resultados obtenidos hasta el momento, son preliminares, sin embargo permiten evaluar que nuestro sistema utilizando una mutante dominante negativa de actina, células hospedera con un citoesqueleto de actina fluorescente y parásitos fluorescentes serán herramientas moleculares muy útiles para el estudio del citoesqueleto de actina durante el proceso de infección de *T. cruzi* así como de otros microorganismos intracelulares. También permitirán el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de las diferentes isoformas de actina y la posible función específica de isoforma.



## Conclusiones

Se pudo obtener transfectantes estables de la línea celular MDCK con ADN de los plásmidos pEGFP-Actin<sup>m</sup> y pEGFP-Actin<sup>i</sup> que codifican para la EGFP fusionada a  $\beta$ -actina truncada y a la EGFP respectivamente.

El expresar una  $\beta$ -actina truncada en las células MDCK provoca cambios severos en la morfología, distribución, organización y función de los filamentos de actina, mostrando un fenotipo consistente con una posible mutante dominante negativa.

La expresión de una  $\beta$ -actina mutada exógena indujo la autorregulación de la  $\beta$ -actina endógena.

Las cinéticas de infección usando células Mut sugieren que el proceso de infección de tripomastigotes y epimastigotes es dependiente de actina mientras que para amastigotes es independiente de microfilamentos.



## Bibliografía

- Alberts Bruce, Dennys Bray, Lewis Julian, Raff Martín Keith Roberts And James D. Watson. (1993). Molecular Biology of The Cell. Ed. 3<sup>er</sup>. Ed. Garland Publishing, Inc. New York USA. 1294pp.
- Alexander, Bahret, Chávez, Courts, D'lessio. (1992). Biología. Ed. Prentice Hall. USA. 717pp.
- Alonso S, Minty A, Bourlet Y, Buckingham M. (1986). Comparison of three actin-coding sequence in the mouse, evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J Mol Evol* **23**:11-22.
- Andrews NW, Hong K, Robbins ES y Nussenzweig V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*, **64**: 474-484.
- Bacallao R, Antony C, Dotti C, Karsenti E, Stelzer EH, Simons K. (1989). The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J Cell Biol*. Dec; **109**(6 Pt 1):2817-32.
- Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Imhof BA. (1998). Actin dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci*. **111**( Pt 12):1649-58.
- Barbosa HS y Meirelles MNL. (1995). Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Struct. Funct*, **20**:275-284.
- Batard P, Jordan M y Wurm F. (2001). Transfer of High Copy Number Plasmid into Mammalian Cells by Calcium Phosphate Transfection. *Gene*. **270**:61-68.
- Benitez-King G, Cazares F, Meza I. (1989). Synthesis and phosphorylation of cytoskeletal proteins during the in vitro biogenesis of MDCK cell monolayers. *J Cell Sci*. May;**93**( Pt 1):53-61.
- Bershadsky Alexander y Juri Vasiliev. (1988). Cytoskeleton. Ed. Pleum Press. New York, USA. 298pp.
- Blanchoin L, Pollard TD. (1998). Interaction of actin monomers with *Acanthamoeba actophorin* (ADF/cofilin) and profilin. *J Biol Chem*. Sep;**273**(39):25106-11.
- Blanchoin L, Pollard TD. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba actophorin* (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem*. May;**274**(22):15538-46.
- Bloom GS, Goldstein LS. (1998). Cruising along microtubule highways: how membranes move through the secretory pathway. *J Cell Biol* May;**141**(4):1095.
- Boschek CB, Jockusch BM, Friis RR, Back R, Grundmann E, Bauer H. (1981). Early changes in the distribution and organization of microfilament proteins during cell transformation. *Cell*. Apr;**24**(1):175-84.
- Brener Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol*. **27**:347-383.
- Burleigh BA y Andrews NW. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol*. **49**:175-200
- Carrier MF, Pantaloni D. (1997). Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol*. Jun;**269**(4):459-67.
- Carrier MF. (1998). Control of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. Feb;**10**(1):45-51.



- Carvalho TMU y De Souza W. (1989). Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophage. *Cell Struct. Funct.* **14**:383-392.
- Carvalho TMU, Ferreira AG, Coimbra ES, Rosestolato CTF y De Souza W. (1999). Distribution of cytoskeletal structures and organelles of host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **31**:325-333.
- Chodias A, Jungbluth A, Sechia, Murphy J, Ullrich A y Marriott G. (1998). The suitability and application of a GFP-actin fusion protein for long-term imaging of the dynamics of the cytoskeleton in mammalian cells. *European Journal Cell Biology.* **77**:81-90.
- Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci.* Nov;**20**(11):448-55.
- De La Cruz EM, Ostap EM, Brundage RA, Reddy KS, Sweeney HL, Safer D. (2000). Thymosin-beta(4) changes the conformation and dynamics of actin monomers. *Biophys J.* May;**78**(5):2516-27.
- De La Cruz EM. (2001). Actin-binding proteins: an overview. *Results Probl Cell Differ.* **32**:123-34.
- Dodemont HJ, Soriano P, Quax WJ, Ramaekers F, Leutra JA, Groenen MAM. (1982). The genes coding for the cytoskeletal proteins actin and vimentin in warm - blooded vertebrates. *EMBO J.* **1**(2):167-71.
- Dos Remedios C. G., D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry, N. J. Nosworthy. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* Apr;**83**(2):433-73.
- Dos Remedios Cg y Thomas Dd. (2001). Molecular interactions of actin. Actin structure and actin-binding proteins. *Heidelberg, Germany:Springer-Verlag*, p. 32.
- Erba HP, Eddy R, Show ST, Kedes L, Gunning P. (1988). Structure, chromosome location and expression of the human  $\gamma$  actin gene: Differential evolution, location and expression of the cytoskeletal  $\beta$  and  $\gamma$  actin genes. *Mol Cell Biol.* **8**(4):1775-89.
- Fernández B, Bodega G, Suárez I y Muñiz E. (2000). Biología Celular. Ed Síntesis. España 2000. pp. 59-88.
- Fonseca CT, Furniel DJM, De Souza W y Carvalho TMU. (2002). Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Structure and Function*, **27**:91-98.
- García ES y Azambuja P. (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*, **7**:240-244.
- Gorman C, Merlino G, Willingham M, Pastan I. y Howard B. (1982). The Rous Sarcoma Virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukariotic cell by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **79**:6777-6781.
- Gottlieb TA, Ivanov IE, Adesnik M, Sabatini DD. (1993). Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* **120**:695-710.



- Gruenheid S. y Finlay B. (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* Apr; **422**(6933):775-81.
- Guirado Blanco O., Solanas García M., Costa Traschel I. and Escrich Escriche E. (2002). The Actin cytoskeletal: a perspective from the molecular biology of the cancer. *Rev Cub Inv Biomed.* **21**(2):115-22.
- Harris DE, Warhaw DM, Periasamy M. (1992). Nucleotide sequences of the rabbit alpha-smooth muscle and non muscle actin mRNAs. *Gene.* **112**(2):265-6.
- Hawkins M, Pope B, Maciver SK, Weeds AG. (1993). Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry.* Sep; **32**(38):9985-93.
- Hayward LJ, Schwartz RJ. (1986). Sequential expression of chicken actin genes during myogenesis. *J Cell Biol.* **102**:1485-93.
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* Dec; **91**(26):12501-4.
- Herget-Rosenthal S, Hosford M, Kribben A, Atkinson SJ, Sandoval RM, Molitoris BA. (2001). Characteristics of EYFP-actin and visualization of actin dynamics during ATP depletion and repletion. *Am J Physiol Cell Physiol.* Dec; **281**(6):C1858-70.
- Hill MA, Gunning P. (1993). Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblast. *J Cell Biol.* **122**(4):825-32.
- Hinz B, Dugina V, Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Chaponnier C. (2003). Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Mol Biol Cell.* Jun; **14**(6):2508-19.
- Hook TC, Newcomb PM, Herman IM. (1991).  $\beta$  actin and its mRNA are located at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J Cell Biol.* **112**(4):653-64.
- Hudson L, Snary D, Morgan SJ. (1984). *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. *Parasitology*, **88**:283-294.
- Jordan M, Schallhorn A y Wurn F. (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Research.* **24**(4):596-601.
- Kabsch W, Vandekerckhove J. (1992). Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **21**:49-76
- Kaji DM, Bates J, Goyzueta JD, Prasadán K y Kumar S. (1996). Transfection alters ion transport in MDCK cells. *Journal Membrane Biol.* **149**:49-55.
- Khorravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ. (1998). Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res.* **72**:55-105.
- Kolien AH y Schaub GA. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatomine. *Parasitol Today*, **16**:381-387.
- Kreis T, Vale R. (Editors). (1999). Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins (2nd ed.). Oxford, UK: Oxford Univ. Press.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug; **227**(5259):680-5.





- Lappalainen P, Kessels MM, Cope MJ, Drubin DG. (1998). The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell*. Aug;**9**(8):951-9.
- Leavitt J., Ng S Y, Aebi U, Varma M, Latter G, Burbeck S, Kedes L y Gunning P. (1987). Expression of transfected mutant  $\beta$ -actin genes: Alterations in cell morphology and evidence for autorregulation in actin pool. *Mol Cell Biol*. **7**;2457-2466.
- Ledezma Palacios Angélica Ruth. (2001). La Sobreexpresión del isotipo  $\beta$  I de tubulina en las células MDCK interfiere con la adhesión y la extensión celular. *Tesis de doctorado*. CINVESTAV, Depto. Biología Celular, México D. F.
- Leiser J, Molitoris BA. (1993). Disease processes in epithelia: the role of the actin cytoskeleton and altered surface membrane polarity. *Biochim Biophys Acta*. Nov;**1225**(1):1-13.
- Lewin B. (2001). Genes VII. Ed Marbar. Madrid, España 2001. pp 533-541
- Ley V, Andrews NW, Robbins ES y Nussenzweig V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med*, **168**:649-659.
- Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V y Andrews NW. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med*, **171**:401-413.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. (2003). Molecular Cell Biology. 4ª ed. New York: Ed. Scientific American Books Inc., p.208-248 y 751-768.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) *J. biol. Chem.* **193**:265-275.
- Maciver SK, Weeds AG. (1994). Actophorin preferentially binds monomeric ADP-actin over ATP-bound actin: consequences for cell locomotion. *FEBS Lett*. Jun;**347**(2-3):251-6.
- Madin SH, Darby NB. (1958). As catalogued in american type culture collection catalog of strains. **2**:47.
- Mitra RD, Silva CM, Youvan DC. (1996). Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene*. **173**(1 Spec No):13-7.
- Montes de Oca G, Ledesma R, Mondragón R, Castillo AM y Meza I. (1997). Myosin I interactions with actin filaments and trans-golgi derived vesicles in MDCK cell monolayers. *Archived Medical Research*. **28**:1-7.
- Morel, C. M., (1999). Chagas disease, from discovery to control and beyond: History, myths and lessons to take home. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94**, Suppl. **1**:3-16.
- Morin JG, Hastings JW. (1971). Energy transfer in a bioluminescent system. *J Cell Physiol*. Jun;**77**(3):313-8.
- Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*. Jun;**13**(12):2656-62.
- Mortara RA. (1991). *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp. Parasitol*, **73**:1-14.



- Mounier N, Perriard JC, Gabbiani G, Chaponnier C. (1997). Transfected muscle and non muscle actins are differentially sorted by cultured smooth muscle and non muscle cells. *J Cell Sci.* **110**:839-45.
- Nakajima Ijima S, Hamada H, Reddy, Kakunaga T. (1985). Molecular structure of the human cytoplasmic  $\beta$  gene. Interspecies homology of sequence in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA.* **82**:6133-7.
- Nayama H, Inaza J, Nishino H, Ohkubo I, Miwawa T. (1996). FISH localization of human cytoplasmic actin gene ACTB to 7p22 and ACTG1 to 17q25 and characterization of related pseudogene. *Cytogenet Cell Genet.* **74**(3):221-4.
- Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D. (1983). The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic  $\beta$  actin gene. *Nucleic Acid Res.* **11**(6):1759-71.
- Pan SC-T. (1978). *Trypanosoma cruzi*: In vitro interactions between cultured amastigotes and human skin- muscle cells. *Exp. Parasitol.* **45**:274-286.
- Perera J, Tormo A, Garcia JL. (2002). *Ingeniería Genética*. Vol. 1 Ed. Síntesis, España 2002. pp 283-304.
- Pollard TD y Cooper JA. (1976). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanism and functions. *Annu Rev Biochem.* **55**:987-1035.
- Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Kedes L. (1984). Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta actin cDNA. *Nucleic Acids Res.* **12**(3):1687-96.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* Feb;**111**(2):229-33.
- Procopio DO, Silva S, Cunningham CC y Mortara RA. (1998). *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp. Parasitology*, **90**:1-13.
- Quitschke WW, Lin ZY, DePonti-Zilli L, Paterson BM. (1998). The  $\beta$  actin promoter. High levels of transcription depend upon ACCAAT binding factor. *J Biol Chem.* **264**(16):9539-45.
- Robinson JM, Dong WJ, Xing J, Cheung HC. (2004). Switching of Troponin I:  $\text{Ca}^{2+}$  and Myosin-induced Activation of Heart Muscle. *J Mol Biol.* Jul;**340**(2):295-305.
- Rodríguez A, Martínez I, Chung A, Berlot CH y Andrews NW. (1999). cAMP regulates  $\text{Ca}^{+2}$  dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by Trypanosomes. *The Journal of Biological Chemistry.* **274**(24):16754-16759.
- Rodríguez A, Rioult GM, Ora A y Andrews NW. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *The Journal of Cell Biology*, **129**(5):1263-1273.
- Rodríguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A y Andrews NW. (1996). Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J. Cell Biol.* **134**:349-362
- Roger Y. Tsien. (1998) The Green Fluorescent Protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:509-44.



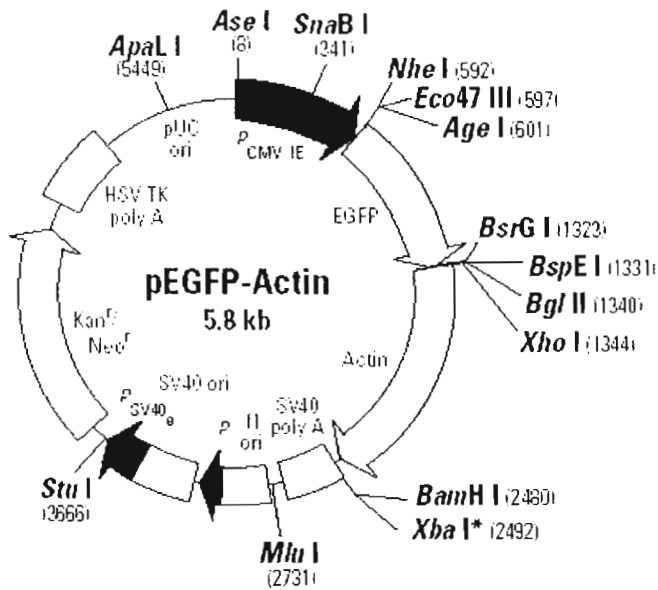
- Rosestolato CTF, Furniel DJ da M, De Souza W y Carvalho TMU. (2002). Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Structure and Function*, **27**:91-98.
- Rubenstein PA y Spudich JA. (1977). Actin microheterogeneity in chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**:120-123.
- Rupprecht AP y Coleman DL. (1991). Transfection of adherent murine peritoneal macrophages with a reporter gene using DEAE-Dextran. *Journal of Immunological Methods*. **144**:157-163.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning*. 2<sup>da</sup> ed. Ed. Vol. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A.
- Sandvig K, van Deurs B. (2002). Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett*. Oct;**529**(1):49-53.
- Schenkman S y Mortara RA. (1992). HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci*. **101**:895-905.
- Schenkman S, Andrews NW, Nussenzweig V y Robbins ES. (1988). *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell*. **55**:157-165.
- Schenkman S, Robbins ES y Nussenzweig V. (1991). Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of target cell cytoskeleton. *Infect. Immun*. **59**:645-654.
- Schevzov G, Lloyd C y Gunning P. (1992). High level expression of transfected  $\beta$ - and  $\gamma$ -actin genes differentially impacts on myoblast cytoarchitecture. *The Journal of Cell Biology*. **117**(4):775-785.
- Schluter K, Jockusch BM, Rothkegel M. (1997). Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. Nov;**1359**(2):97-109.
- Schmit A y Hall MN. (1998). Signalin to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **14**:305-38.
- Sheterline P, Clayton J, Sparrow J. (1995). Actin. *Protein Profile*. **2**(1):1-103.
- Sibley L. D. (2004). Intracellular parasite invasion strategies. *Science* **304**.
- Small JV y Gimona M. (1998). The cytoskeleton on the vertebrate smooth muscle cell. *Acta Physiol Scand*. **164**:341-8.
- Small JV, Rother K, Kaverina I. (1999). Functional design in the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. **11**:54-60.
- Strauss E. (1996). Intracellular pathogens: A virus joins the movement. *Current Biology*. **6**(5):504-507.
- Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW. (1994). Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free  $Ca^{2+}$  transients. *J Exp Med*. Mar1;**179**(3):1017-22.
- Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*. Dec;**71**(7):1117-30.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep;**76**(9):4350-4.



- Tsien Roger Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annual Review Biochemical*. **67**:509-544.
- Umezawa ES, Milder RV y Abrahamsohn IA. (1985). *Trypanosoma cruzi* amastigotes: development in vitro and infectivity in vivo of the forms isolated from spleen and liver. *Acta Tropica (Basel)* **42**:25-32.
- Vandekerckhove, J. y Weber, K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: An analysis based on the amino acid sequence of the amino terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* **126**:783-802.
- Vasioukhin V y Fuchs E. (2001). Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol.* Feb;**13**(1):76-84.
- Wear M., Schafer D. A. y Cooper J. (2000). Actin dynamics: assembly and disassembly of actin networks. *Current Biology*, **10**(24):R891-895.
- Westphal M, Jungbluth A, Heidecker M, Mühlbauer B, Heizer C, Schwartz JMG y Gerisch. (1997). Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. *Current Biology*. **7**:176-183.
- Wittenmayer N, Rothkegel M, Jockusch y Schlüter K. (2000). Functional characterization of green fluorescent protein-profilin fusion proteins. *European Journal Biochemical*. **267**:5247-5256.
- Wolfe Stephen L. (1993). Molecular and Cellular Biology. Ed. Wadworth. California USA. 1145 pp.
- Woolsey AM y Burleigh BA. (2004). Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiology*, **6**(9), 829-838.
- Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr. (1996). Molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. **14**:1246-1251.
- Yao X, Chaponnier C, Gabbiani G y Forte JG. (1995). Polarized distribution of actin isoforms in gastric parietal cells. *Mol Cell Biol*. **6**:541-557.
- Yeman C, Grindstaff KK, Nelson WJ (1999) New Perspectives on Mechanisms Involved in Generating Epithelial Cell Polarity. *Physiology Reviews*. **79**:73-98.
- Zeledon, R. (1997). Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*. *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas*. Editora Fiocruz. **1**:271-28

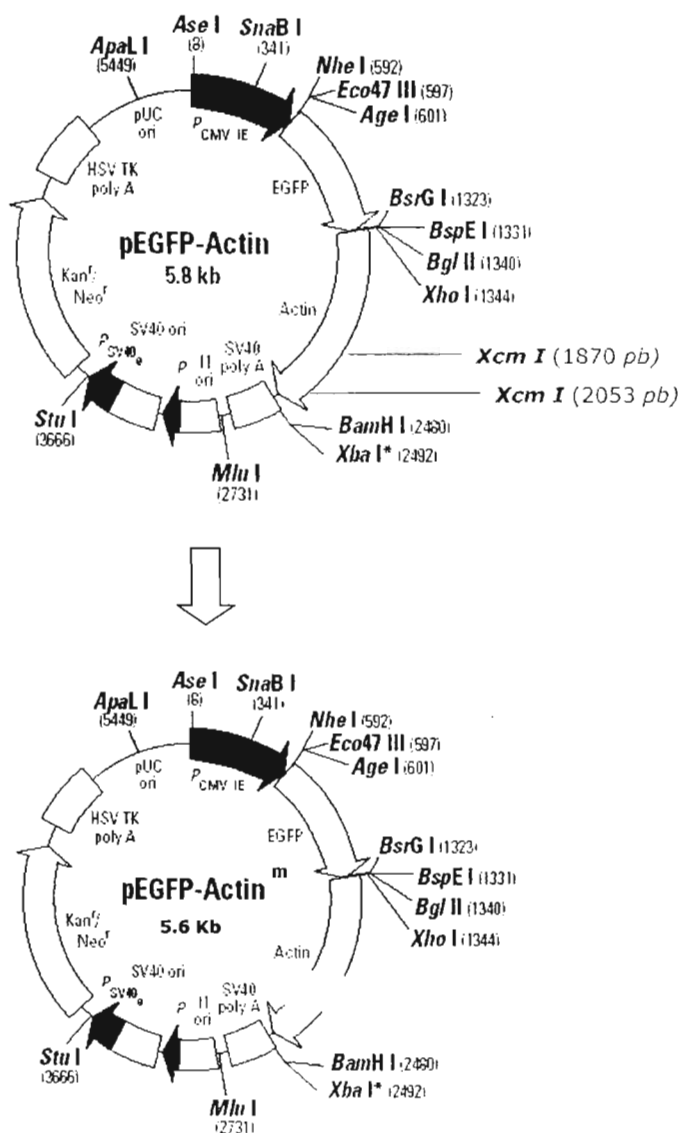


## Apéndice



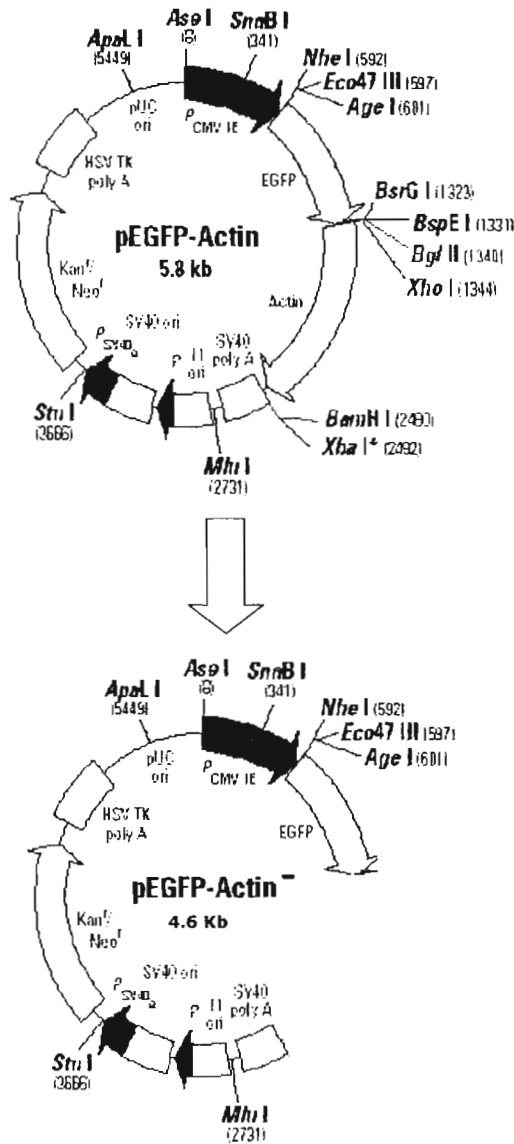
Mapa de restricción del vector de información de la Proteína Verde Fluorescente Aumentada (EGFP) fusionada a la  $\beta$ -actina (pEGFP-Actin) de 5.8 Kb. Se muestran las enzimas y su lugar de corte, todas tienen un solo sitio de corte y el sitio *Xba I* está metilado. Este vector se tomó para obtener el vector pEGFP-Actin<sup>™</sup> (Mut) y pEGFP-Actin<sup>™</sup> (Mock).





El vector de información de la Proteína Verde Fluorescente Aumentada (EGFP) fusionada a la  $\beta$ -actina (pEGFP-Actin) de 5.8 Kb, se trato con *Xcm I* con dos sitios de corte en la secuencia que codifica para  $\beta$ -actina deletando 174 pb, posteriormente se trato con T4 ADN ligasa para religar y así obtener el vector pEGFP-Actin<sup>m</sup> (Mut) de 5.6 Kb.





El vector de información de la Proteína Verde Fluorescente Aumentada (EGFP) fusionada a la  $\beta$ -actina (pEGFP-Actin) de 5.8 Kb, se trato con *Bgl* II y con *BamH* I con un sitio de corte cada una deletando la secuencia completa que codifica para  $\beta$ -actina quedando solamente la EGFP, posteriormente se trato con T4 ADN ligasa para religar y así obtener el vector pEGFP-Actin<sup>-</sup> (Mock) de 4.6 Kb.



**Secuencia completa del plásmido original pEGFP-Actin.**

■ **Secuencia de la EGFP**

■ **Secuencia de  $\beta$ -actina exógena humana**

■ **Secuencia deletada para obtener  $\beta$ -actina exógena humana mutada**

1	TAGTTATTAA	TAGTAATCAA	TTACGGGGTC	ATTAGTTCAT	AGCCCATATA	TGGAGTCCG
70	CGTTACATAA	CTTACGGTAA	ATGGCCCGCC	TGGCTGACCG	CCCAACGACC	CCCGCCCAT
130	GACGTCAATA	ATGACGTATG	TTCCCATAGT	AACGCCAATA	GGGACTTTCC	ATTGACGTCA
190	ATGGGTGGAG	TATTTACGGT	AAACTGCCCA	CTTGGCAGTA	CATCAAGTGT	ATCATATGCC
250	AAGTACGCCC	CCTATTGACG	TCAATGACGG	TAAATGGCCC	GCCTGGCATT	ATGCCCAGTA
310	CATGACCTTA	TGGGACTTTC	CTACTTGGCA	GTACATCTAC	GTATTAGTCA	TCGCTATTAC
370	CATGGTGATG	CGGPTTTGGC	AGTACATCAA	TGGGCGTGA	TAGCGGTTTG	ACTCACGGGG
430	ATTTCCAAGT	CTCCACCCCA	TTGACGTCAA	TGGGAGTTTG	TTTTGGCACC	AAAATCAACG
490	GGACTTTCCA	AAATGTCGTA	ACAACCTCCG	CCCATTGACG	CAAATGGGCG	GTAGGCGTGT
550	ACGGTGGGAG	GTCTATATAA	GCAGAGCTGG	TTTAGTGAAC	CGTCAGATCC	GCTAGCGCTA
610	CCG <b>GTCCCA</b>	CCATGGT <b>GAG</b>	CAAGGGCG <b>GAG</b>	GAGCTGT <b>CA</b>	CCGGGGTGG <b>T</b>	GCCCATC <b>CTG</b>
670	<b>GTCGAGCTGG</b>	<b>ACGGCGACGT</b>	<b>AAACGGCCAC</b>	<b>AAGTTCAGCG</b>	<b>TGTCGGGCGA</b>	<b>GGGCGAGGGC</b>
730	<b>GATGCCACCT</b>	<b>ACGGCAAGCT</b>	<b>GACCTGAAG</b>	<b>TTCATCTGCA</b>	<b>CCACCGGCAA</b>	<b>GCTGCCCGTG</b>
790	<b>CCCTGGCCCA</b>	<b>CCCTCGTGAC</b>	<b>CACCTGACC</b>	<b>TACGGCGTGC</b>	<b>AGTGCTTCAG</b>	<b>CCGCTACCCC</b>
850	<b>GACCAATGA</b>	<b>AGCAGCACGA</b>	<b>CTTCTCAAG</b>	<b>TCCGCCATGC</b>	<b>CCGAAGGTTA</b>	<b>CGTCCAGGAG</b>
910	<b>CGCACCATCT</b>	<b>TCTTCAAGGA</b>	<b>CGACGGCAAC</b>	<b>TACAAGACCC</b>	<b>GCGCCGAGGT</b>	<b>GAAGTTCGAG</b>
970	<b>GGCGACACCC</b>	<b>TGGTGAACCG</b>	<b>CATCGAGCTG</b>	<b>AAGGGCATCG</b>	<b>ACTTCAAGGA</b>	<b>GGACGGCAAC</b>
1030	<b>ATCCTGGGGC</b>	<b>ACAAGCTGGA</b>	<b>GTACAACCTAC</b>	<b>AACAGCCACA</b>	<b>ACGTCTATAT</b>	<b>CATGGCCGAC</b>
1090	<b>AAGCAGAAGA</b>	<b>ACGGCATCAA</b>	<b>GSTGAACCTT</b>	<b>AAGATCCGCC</b>	<b>ACAACATCGA</b>	<b>GGACGGCAGC</b>
1150	<b>GTGCAGCTCG</b>	<b>CCGACCACTA</b>	<b>CCAGCAGAAC</b>	<b>ACCCCATCG</b>	<b>GCGACGGCCC</b>	<b>CGTGTCTGTG</b>
1210	<b>CCCGACAACC</b>	<b>ACTACCTGAG</b>	<b>CACCCAGTCC</b>	<b>GCCCTGAGCA</b>	<b>AAGACCCCAA</b>	<b>CGAGAAGCGC</b>
1270	<b>GATCACATGG</b>	<b>TCCTGCTGGA</b>	<b>GTTCTGTACC</b>	<b>GCCGCCGGGA</b>	<b>TCACTCTCGG</b>	<b>CTGTGACGAG</b>
1330	<b>CTGTACAAGT</b>	<b>CCGGACTCAG</b>	<b>ATCTCGAGCT</b>	<b>ATGGATGATG</b>	<b>ATATCGCCCG</b>	<b>CCTCGTCTGC</b>
1390	<b>GACAACGGCT</b>	<b>CCGGCATGTG</b>	<b>CAAGGCCGGC</b>	<b>TTGCGGGGCG</b>	<b>ACGATGCCCC</b>	<b>CCGGGCCGTG</b>
1450	<b>TTCCCTTCCA</b>	<b>TCGTGGGGCG</b>	<b>CCCCAGGCAC</b>	<b>CAGGGCGTGA</b>	<b>TGGTGGGCAT</b>	<b>GGGTGAGAAG</b>
1510	<b>GATTCTTATG</b>	<b>TGGCCGACGA</b>	<b>GGCCAGAGC</b>	<b>AAGAGAGGCA</b>	<b>TCCTCACCTT</b>	<b>GAAGTACCCC</b>
1570	<b>ATCGAGCAGC</b>	<b>CACTCGTCCAC</b>	<b>CAACTGGGAC</b>	<b>GACATGGAGA</b>	<b>AAATCTGGCA</b>	<b>CACACCTTTC</b>
1630	<b>TACAATGAGC</b>	<b>TGCCTGTGGC</b>	<b>TCCCGAGGAG</b>	<b>CACCCCGTGC</b>	<b>TGCTGACCGA</b>	<b>GGCCCCCTGT</b>
1690	<b>AACCCCAAGG</b>	<b>CCAACCGCGA</b>	<b>GAAGATGACC</b>	<b>CAGATCATGT</b>	<b>TTGAGACCTT</b>	<b>CAACCCCCA</b>
1750	<b>GCCATGTACG</b>	<b>TTGCTATCCA</b>	<b>GGCTGTGCTA</b>	<b>TCCTGTACG</b>	<b>CCTCTGGCCG</b>	<b>TACCACTGGC</b>
1810	<b>ATCGTGATGG</b>	<b>ACTCCGGTGA</b>	<b>GGGGTCCACC</b>	<b>CACACTGTGC</b>	<b>CCATCTACGA</b>	<b>GGGGTATGCC</b>
1870	<b>CTCCCCCATG</b>	<b>CCATCCTGCG</b>	<b>TCTGGACCTG</b>	<b>GCTGGCCGGG</b>	<b>ACCTGACTGA</b>	<b>CTACCTCATG</b>
1930	<b>AAGATCTCCA</b>	<b>CCGAGCGCGG</b>	<b>CTACAGCTTC</b>	<b>ACCACCACGG</b>	<b>CCGAGCGGGA</b>	<b>AATCGTGCCT</b>
1990	<b>GACATTAAGG</b>	<b>AGAAGCTGTG</b>	<b>CTACGTCCGC</b>	<b>CTGGACTTCG</b>	<b>AGCAAGAGAT</b>	<b>GGCCACGGCT</b>
2050	<b>GCTTCCAGCT</b>	<b>CCTCCCTGGA</b>	<b>GAAGAGCTAC</b>	<b>GAGCTGCCTG</b>	<b>ACGGCCAGGT</b>	<b>CATCACCAAT</b>
2110	<b>GGCAATGAGC</b>	<b>GGTCCGCTG</b>	<b>CCCTGAGGCA</b>	<b>CTCTTCCAG</b>	<b>CTTCTTCTCT</b>	<b>GGGCATGGAG</b>
2170	<b>TCCTGTGGCA</b>	<b>TCCACGAAAC</b>	<b>TACCTTCAAC</b>	<b>TCCATCATGA</b>	<b>AGTGTGACGT</b>	<b>GGACATCCCG</b>
2230	<b>AAAGACTCTG</b>	<b>ACGCCAACAC</b>	<b>AGTCTGTCT</b>	<b>GGCGGCACCA</b>	<b>CCATGTACCC</b>	<b>TGGCATTGCC</b>
2290	<b>GACAGGATGC</b>	<b>AGAAGGAGAT</b>	<b>CACTGCCCTG</b>	<b>GCACCCAGCA</b>	<b>CAATGAAGAT</b>	<b>CAAGATCATT</b>
2350	<b>GCTCCTCTGT</b>	<b>AGCGCAAGTA</b>	<b>CTCDGTGTGG</b>	<b>ATCGGCCGCT</b>	<b>CCATCTTGGC</b>	<b>CTCGTGTCC</b>
2410	<b>ACCTTCCAGC</b>	<b>AGATGTGGAT</b>	<b>CAGCAAGCAG</b>	<b>GAGTATGACG</b>	<b>AGTCCGGCCC</b>	<b>CTCCATCGTC</b>
2470	<b>CACCGCAAT</b>	<b>GCTTCTAGGG</b>	<b>ATCCACCGGA</b>	<b>TCTAGATAAC</b>	<b>TGATCATAAT</b>	<b>CAGCCATACC</b>
2530	<b>ACATTTGTAG</b>	<b>AGGTTTTACT</b>	<b>TGCTTTAAAA</b>	<b>AACTCCACAC</b>	<b>ACCTCCCCCT</b>	<b>GAACCTGAAA</b>
2590	<b>CATAAAATGA</b>	<b>ATGCAATTGT</b>	<b>TGTTGTAAAC</b>	<b>TTGTTTATTG</b>	<b>CAGCTTATAA</b>	<b>TGTTTACAAA</b>





2650	TAAAGCAATA	GCATCACAAA	TTTCACAAAT	AAAGCATTTT	TTTCACTGCA	TTCTAGTTGT
2710	GGTTTGTCCA	AACTCATCAA	TGTATCTTAA	CGCGTAAATT	GTAAGCGTTA	ATATTTTGTT
2770	AAAATTCCGG	TAAATTTTT	GTTAAATCAG	CTCATTTTTT	AACCAATAGG	CCGAAATCGG
2830	CAAAATCCCT	TATAAATCAA	AAGAATAGAC	CGAGATAGGG	TTGAGTGTG	TTCCAGTTTG
2890	GAACAAGAGT	CCACTATTAA	AGAACGTGGA	CTCCAACGTC	AAAGGGCGAA	AAACCGTCTA
2950	TCAGGGCGAT	GGCCCACTAC	GTAACCATC	ACCCTAATCA	AGTTTTTTGG	GGTCGAGGTG
3010	CCGTAAGCA	CTAAATCGGA	ACCCTAAAG	GAGCCCCGA	TTTAGAGCTT	GACGGGGAAA
3070	GCCGGCGAAC	GTGGTCGAA	AGGAAGGGAA	GAAAGCGAAA	GGAGCGGGC	CTAGGCGCT
3130	GGCAAGTGTA	GCGTCCAGC	TGCGCGTAAC	CACCACACC	GCCGCGCTTA	ATGCGCGCT
3190	ACAGGGCGCG	TCAGGTGGCA	CTTTTCGGGG	AAATGTGCGC	GAACCCCTA	TTTGTTTATT
3250	TTTCTAAATA	CATTCAAATA	TGTATCCGCT	CATGAGACAA	TAACCTGTAT	AAATGCTTCA
3310	ATAATATTGA	AAAAGGAAGA	GTCCGTAGGC	GGAAAGAACC	AGCTGTGGAA	TGTGTGTGAG
3370	TTAGGGTGTG	GAAAGTCCCC	AGGCTCCCCA	GCAGGCAGAA	GTATGCAAAG	CATGCATCTC
3430	AATTAGTCAG	CAACCAGGTG	TGGAAAGTCC	CCAGGCTCCC	CAGCAGGCAG	AAGTATGCAA
3490	AGCATGCATC	TCAATTAGTC	AGCAACCATA	GTCCCGCCCT	TAACCTCCGC	CATCCCGCC
3550	CTAACTCCGC	CCAGTCCGC	CCATTCTCCG	CCCCATGGCT	CGTAATTTT	TTTTATTAT
3610	GCAGAGGCCG	AGGCCGCCCT	GGCCTCTGAG	CTAATCCAGA	AGTAGTGAGG	AGGCTTTTTT
3670	GGAGGCCTAG	GCTTTTGCAA	AGATCGATCA	AGAGACAGGA	TGAGGATCGT	TTCCGATGAT
3730	TGAACAAGAT	GGATTGCACG	CAGGTTCTCC	GGCCGCTTGG	GTGGAGAGGC	TATTCGGCTA
3790	TGACTGGGCA	TGTGATCCGA	TGGCTGCTC	TGATGCCGGT	CGTGTCCGG	TGTCGGCGCA
3850	GGGGCGCCCG	GTTCTTTTTG	TCAAGACCGA	CCCTGTCCGG	GCCCTGAATG	AACTGCAACA
3910	CGAGGCAGCG	GGGCTATCGT	GGCTGGCCAC	GACGGGGCTT	CCTTGCCGAG	CTGTGTCCGA
3970	CGTTGTCACT	GAAGCGGGAA	GGGACTGGCT	GCTATTGGCG	GAAGTGCCGG	GGCAGGATCT
4030	CCGTGCATCT	CACCTTGCTC	CTGCCGAGAA	AGTATCCATC	ATGGCTGATG	CAATGCGGG
4090	GCTGCATACG	CTTGATCCGG	CTACCTGCC	ATTCGACCAC	CAAGCGAAAC	ATCCGATCGA
4150	GGAGGACAGT	ACTCGGATGG	AAGCCGGTCT	TGTCGATCAG	GATGATCTGG	ACGAAGAGCA
4210	TCAGGGGCTC	GCGCCAGCCG	AACTGTTCGC	CAGGCTCAAG	GCGAGCATGC	CCGACGGCGA
4270	GGATCTGCCT	GTGACCCATG	GGATGCGCTG	CTTGCCGAAT	ATCATGGTGG	AAAATGGCCG
4330	CTTTTCTGGA	TTCATCGACT	GTGGCCGGCT	GGTGTGGCG	GACCCGTATC	AGGACATAGC
4390	GTTGGCTACC	CGTGATATTG	CTGAAGAGCT	TGGCGGGCAA	TGGGCTGACC	GCTTCTCTGT
4450	GCTTTACGGT	ATCGCCGCTC	CCGATTCCGA	GCGCATCGCC	TTCTATCGCC	TTCTTGACGA
4510	GTTCTTCTGA	GCGGGACTCT	GGGGTTCGAA	ATGACCGACT	AAGCGACGCC	CAACCTGCCA
4570	TTACAGAGAT	TGCATTCCAC	GCCCGCCTTC	TATGAAAGTT	TGGGCTTCGG	AAATCGTTTT
4630	CGGGACGCCG	GCTGGATGAT	CCTCCAGCGC	GGGATCTCA	TGCTGGAGTT	CTTCGCCAC
4690	CCTAGGGGGA	GGCTAACTGA	AACACGGAAG	GAGACAATAC	CGGAAGGAAC	CCGCGCTATG
4750	ACGGCAATA	AAAGACAGAA	TAAAACGCAC	GGTGTGGGT	CGTTTGTTCA	TAAACGGGG
4810	GTTCGGTCCC	AGCGTCCGCA	CTCTGTCGAT	ACCCACCGA	GACCCCATTG	GGGCCAATAC
4870	GCCCGGTTTT	CTTCTTTTT	CCCACCCAC	CCCCAAGTT	CGGGTGAAGG	CCCAGGGCTC
4930	GCAGCCAACG	TCGGGGCGGC	AGGCCCTGCC	ATAGCCTCAG	GTACTCATA	TATACTTTTAG
4990	ATTGATTTAA	AACTTCATTT	TTAATTTAAA	AGGAICTAGG	TGAAGATCCT	TTTTGATTAAT
5050	TCATGACCA	AAATCCCTTA	ACGTGAGTTT	TCGTCCACT	GAGCGTCAGA	CCCCGTAGAA
5110	AAGATCAAAG	GATCTTCTTG	AGATCCTTTT	TTTCTGCGG	TAATCTGCTG	CTTGCAAACA
5170	AAAAAACCC	CGCTACCAGC	GGTGGTTTGT	TTGCCGGAT	AAGAGCTACC	AACTCTTTT
5230	CGAAGGTAA	CTGGCTTCAG	CAGAGCCGAG	ATACCAATA	CTGTCTTCT	AGTGTAGCCG
5290	TAGTTAGGCC	ACGACTTCAA	GAACTCTGTA	GCACCGCCTA	CATACCCTGC	TCTGCTAATC
5350	CTGTTACCAG	TGGCTGCTGC	CAGTGGCGAT	AAGTCGTGTC	TTACCGGTT	GGACTCAAGA
5410	CGATAGTTAC	CGGATAAGGC	GCAGCGTCCG	GGCTGAACGG	GGGGTTCGTC	CACACAGCCC
5470	AGCTTGGAGC	GAACGACCTA	CACCGAACTG	AGATACCTAC	AGCGTGAAGT	ATGAGAAAGC
5530	GCCACGCTTC	CCGAAGGGAG	AAAGGCGGAC	AGGTAICCGG	TAAGCGGAG	GGTCGGAACA
5590	GGAGAGCGCA	CGAGGGAGCT	TCCAGGGGGA	AACGCCCTGGT	ATCTTTATAG	TCCGTGCGGG
5650	TTTCGCCACC	TCTGACTTGA	GCGTCGATTT	TTGTGATGCT	CGTCAGGGGG	GCGGAGCCTA
5710	TGGAAAAACG	CCAGCAACCG	GGCCTTTTFA	CGGTTCTCTG	CCTTTTGGTC	GCCTTTTGGT
5770	CACATGTTCT	TTCCTGCTTA	ATCCCTGAT	TCTGTGGATA	ACCGTATTAC	GCGCATGCAAT

