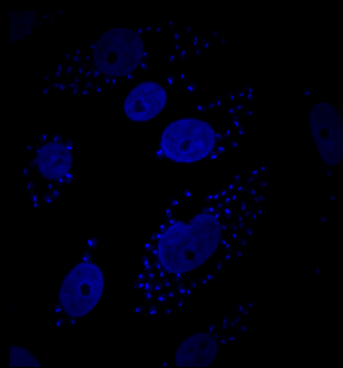




Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas -
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

CARACTERIZACION DE LA PROTEINA CON
BROMODOMINIO BDF1 DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
(*Tc*BDF1) Y SU PARTICIPACION EN LA ACETILACION
DE PROTEINAS GLICOSOMALES.



Presentado por Carla Ritagliati

Rosario, Argentina

2015

CARACTERIZACION DE LA PROTEINA CON
BROMODOMINIO BDF1 DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
(*Tc*BDF1) Y SU PARTICIPACION EN LA
ACETILACION DE PROTEINAS GLICOSOMALES.

Carla Ritagliati

Licenciada en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Biología y Bioquímica de *Trypanosoma cruzi* del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET) y de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01 de diciembre de 2011 y el 25 de noviembre de 2015, bajo la dirección del Dr. Esteban C. Serra.

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

Publicaciones

Ritagliati C., Villanova G.V., Alonso V.L., Zuma A., Cribb P., Motta C. y Serra E.C. "Glycosomal Bromodomain Factor 1 from *Trypanosoma cruzi* enhances trypomastigotes cell infection and intracellular amastigotes growth". *Biochem J* 2015 Oct 23. pii: BJ20150986.

Ritagliati C., Alonso V.L., Manarin R., Cribb P. y Serra E.C. "Overexpression of cytoplasmic TcSIR2RP1 and mitochondrial TcSIR2RP3 impacts on *Trypanosoma cruzi* growth and cell invasion". *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Apr 15;9(4):e0003725. doi: 10.1371/journal.pntd.0003725

Congresos y Reuniones Científicas

XXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, noviembre de 2015, Rosario, Argentina. "El bromodominio glicosomal TcBDF1 es un factor de patogenicidad de *Trypanosoma cruzi*". Ritagliati C., Cribb P. y Serra E.

XXV Reunión Anual de Parasitología Molecular, septiembre de 2015, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, EEUU. "*Trypanosoma cruzi* sirtuins as drug targets for Chagas Disease" Ritagliati C., Alonso V.L., Cribb P., Serra E.C.

X Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, noviembre de 2014, Mar del Plata, Argentina. "Characterization of *Trypanosoma cruzi*'s sirtuins" Ritagliati C., Alonso V.L., Manarin R., Serra E.C.

L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular, noviembre de 2014, Rosario, Argentina. "Characterization of *Trypanosoma cruzi*'s sirtuins" Ritagliati C., Alonso V.L., Manarin R., Serra E.C.

XXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, octubre de 2013, Rosario, Argentina. "La sobreexpresión de una versión mutada del factor con bromodominio 1 de *Trypanosoma cruzi* es deletérea para su crecimiento". Ritagliati C., Cribb P. y Serra E.

XXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, octubre de 2013, Rosario, Argentina. "Conversión del vector de *Trypanosoma cruzi* pTcINDEX al sistema de clonado por recombinación Gateway". Alonso V., Ritagliati C., Cribb P. y Serra E.

Pre-Congreso "Enfermedad de Chagas", realizado en el marco del XXXI Congreso Nacional de Cardiología. Mayo de 2013. Facultad de Ciencias Médicas – UNR. "El Factor con Bromodominio 1 de *Trypanosoma cruzi* se localiza en los glicosomas, dirigido por su secuencia N-terminal". Ritagliati C., Villanova G.V., Alonso V., Cribb P. y Serra E.

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular, octubre de 2012, Mendoza, Argentina. "Bromodomain factor 1 of *Trypanosoma cruzi* is localized in the glycosomes, targeted by an N-terminal sequence". Ritagliati C., Villanova G.V., Alonso V., Cribb P. y Serra E.

IX Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, noviembre de 2011, Mar del Plata, Argentina. "Bromodomain factor 1 of *Trypanosoma cruzi* is targeted to the glycosomes by an N-terminal sequence". Ritagliati C., Villanova G.V., Alonso V., Cribb P. y Serra E.

XXIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, octubre de 2010, Córdoba, Argentina. "TcBDF1, una proteína glicosomal con bromodominio". Ritagliati C., Villanova G.V., Alonso V., Cribb P. y Serra E.

XXIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología, octubre de 2010, Córdoba, Argentina. "Desacetilasas citoplasmáticas en *Trypanosoma cruzi*". Alonso V., Ritagliati C., Cribb P. y Serra E.

INDICE

INDICE	3
ABREVIATURAS	6
LENGUAJE ESPECIAL	8
RESUMEN	9
INTRODUCCION	11
TRYPANOSOMA CRUZI	11
CLASIFICACION	11
ENFERMEDAD DE CHAGAS	12
MORFOLOGIA Y ESTADIOS EVOLUTIVOS	14
CICLO DE VIDA	15
CARACTERISTICAS INUSUALES	17
EL NUCLEO Y GENETICA DE TRYPANOSOMAS	18
METABOLISMO ENERGETICO	19
ACETILACION	27
EL AUJE DE LA ACETILACION	28
ACETILTRANSFERASAS	31
DEACETILASAS	32
BROMODOMINIOS	38
OBJETIVOS	48
RESULTADOS Y DISCUSION	49
CAPITULO I: "ACETILACION EN TRYPANOSOMA CRUZI"	49
I.1. HAY DIVERSAS PROTEÍNAS NO NUCLEARES ACETILADAS EN <i>T. CRUZI</i> .	49
I.2. IDENTIFICACIÓN DEL ACETILOMA.	49
DISCUSION	51
CAPITULO II: "FACTOR CON BROMODOMINIO 1 DE <i>T. CRUZI</i>"	53
II.1. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE <i>TcBDF1</i>	53
II.2. <i>TcBDF1</i> TIENE UNA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DURANTE EL CICLO DE VIDA DE <i>T. CRUZI</i> .	55
II.3. <i>TcBDF1</i> SE LOCALIZA EN EL GLICOSOMA.	56
II.4. <i>TcBDF1</i> ES DIRIGIDA A LOS GLICOSOMAS POR UNA PTS-2.	59
II.5. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS SOBREENPRESANTES PARA <i>TcBDF1</i> .	61
II.6. CHEQUEO DE LA INDUCCIÓN DE LAS CEPAS TRANSFECTANTES.	63
II.7. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>TcBDF1</i> SALVAJE Y MUTANTE SOBREENPRESADAS.	64
II.8. LA SOBREENPRESIÓN DE <i>TcBDF1</i> SALVAJE, PERO NO DE LA DOBLE MUTANTE, ES DELETÉREO PARA EL CRECIMIENTO DE LOS EPIMASTIGOTES.	65
II.9. ANÁLISIS DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LOS TRANSFECTANTES.	66

II.10. METACICLOGÉNESIS <i>IN VITRO</i> .	67
II.11. ENSAYOS DE INFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO.	68
DISCUSION	70
CAPITULO III: "SIRTUINAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>".	72
III.1. IDENTIFICACIÓN DE HOMÓLOGOS DE SIR2 EN <i>T. CRUZI</i> .	72
III.2. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	74
III.3. EXPRESIÓN DE LAS SIRTUINAS EN EL CICLO DE VIDA DE <i>T. CRUZI</i> .	76
III.4. OBTENCIÓN DE CEPAS SOBREENPRESANTES.	77
III.5. <i>TcSIR2RP1</i> SE LOCALIZA EN EL CITOSOL Y <i>TcSIR2RP3</i> EN LA MITOCONDRIA.	79
III.6. ACTIVIDAD DEACETILASA DE LAS SIRTUINAS DE <i>T. CRUZI</i> .	80
III.7. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE LOS PARÁSITOS SOBREENPRESANTES DE <i>TcSIR2RP1</i> Y <i>TcSIR2RP3</i> .	81
III.8. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LAS SIRTUINAS EN EL CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES.	82
III.9. LA SOBREENPRESIÓN DE <i>TcSIR2RP1</i> ESTIMULA LA DIFERENCIACIÓN DE EPIMASTIGOTES A TRIPOMASTIGOTES METACÍCLICOS.	83
III.10. LA SOBREENPRESIÓN DE LAS SIRTUINAS AFECTA LA INFECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.	84
III.11. LA SOBREENPRESIÓN DE <i>TcSIR2RP1</i> Y <i>TcSIR2RP3</i> PROTEGE AL PARÁSITO DEL TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE SIRTUINAS.	86
III.11. <i>TcSIR2RP3</i> ESTÁ INVOLUCRADA EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO.	87
DISCUSION	88
CONCLUSIONES	91
MATERIALES Y METODOS	94
HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS	94
BASES DE DATOS	94
ANÁLISIS DE SECUENCIAS	94
MEDIOS DE CULTIVOS Y CEPAS	94
MEDIOS Y CEPAS BACTERIANAS	94
MEDIOS Y CEPAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	95
TECNICAS DE CULTIVO DE <i>T. CRUZI</i>	96
INFECCIONES <i>IN VITRO</i>	96
OBTENCIÓN DE AMASTIGOTES	97
OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES	97
OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS (<i>METACICLOGÉNESIS IN VITRO</i>)	98
TINCIÓN CON COLORANTE GIEMSA	98
CONTAJE DE CÉLULAS	98
TRATAMIENTO DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> CON COMPUESTOS	98
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	99
TECNICAS PARA EL TRABAJO CON PROTEINAS	99
EXPRESIÓN DE PROTEINAS EN <i>E. COLI</i>	99
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	100
INMUNIZACIÓN DE CONEJOS PARA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS	100
PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS	100
EXTRACTOS PROTEICOS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	100

SEPARACION DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	103
ELECTRO-ELUCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE GELES DE ACRILAMIDA	103
WESTERN BLOT	103
INMUNOCITOLocalización	104
IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ACETILADAS POR INMUNOPRECIPITACIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASA.	104
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	105
TECNICAS PARA EL TRABAJO CON ACIDOS NUCLEICOS	105
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	105
MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA TIPO ZOE-PCR	106
DIGESTIÓN DE ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	107
ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	107
PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	108
PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. COLI</i>	108
SECUENCIACIÓN DE ADN	108
OBTENCIÓN DE ADN TOTAL DE <i>T. CRUZI</i>	108
CLONADO EN VECTORES TIPO T	108
CLONADO POR DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN	108
CLONADO POR RECOMBINACIÓN	109
PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE <i>E. COLI</i>	109
TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN	109
TRANSFECCIÓN DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	110
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	111
ANEXO	124
NOTAS	128

ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
Ac	Acetilada
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosina di fosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	ARN guía
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosina tri-fosfato
BET	Bromo and extra terminal domain
BSA	Albumina sérica bovina
BLAST	Basic Local Alignment and Search Tool
BRD	Bromodominio
C-terminal	Carboxilo terminal
csp	Cantidad suficiente para
CDS	Secuencia codificantes
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
dNTP	2'-desoxinucléosido 5'-trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
DTU	Unidad de tipificación discreta
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GFP	Proteína verde fluorescente
HA	Hemaglutinina
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona desacetilasa
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IPTG	Isopropil--D-tiogalactósido
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
KAT	Lisina acetiltransferasa
KDAC	Lisina desacetilasa
LB	Luria Bertani
LIT	Infusión hígado-triptosa

MM	Marcador molecular
MPT	Modificación postraduccional
N-terminal	Amino terminal
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAM	Nicotinamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGC	Polycistronic gene cluster
PM	Peso molecular
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro VII
poli-A	tracto de Adeninas
PTS	Señal de transporte al peroxisoma
RE	Retículo endoplásmico
RMN	Resonancia magnética nuclear
SIRT	Sirtuínas
ssp	especies
TAE	Tris-acetato-EDTA
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbónicos
TSA	Tricostatina A
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Tet	Tetraciclina
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indoil-D-galactósido
SDS	Dodecilsulfato sódico
PAGE	Poliacrilamide gel electroforesis

LENGUAJE ESPECIAL

Loop: bucle o lazo, conecta elementos de estructura secundaria.

Trans-splicing: corte y empalme entre dos moléculas.

Pool: grupo o conjunto encontrado en un determinado espacio.

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

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

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado y el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Tiene un ciclo de vida complejo que alterna entre dos huéspedes y por lo menos tres estadios de desarrollo diferentes. Actualmente, el tratamiento de la enfermedad de Chagas depende de drogas que son tóxicas para el hospedador y susceptibles a mecanismos de resistencia del parásito. Por lo tanto es necesario encontrar nuevos blancos para determinar alternativas terapéuticas más eficientes. Además, este parásito presenta características únicas que lo hacen un interesante modelo para el estudio de diversos procesos propios de las células eucariotas.

La acetilación se ha revelado en los últimos años como una de las modificaciones postranscripcionales más frecuentes, tanto en bacterias como en células eucariotas, de naturaleza conservada y ubicua, lo que sugiere un alto poder regulatorio que lleva a compararla con la fosforilación de proteínas. Esta es una modificación covalente llevada a cabo por enzimas denominadas Lisina Acetiltransferasas y Lisina Deacetilasas.

El bromodominio, es el único dominio proteico de unión a lisina acetilada, presente casi exclusivamente en proteínas de localización nuclear.

Para entender mejor la acetilación como mecanismo de regulación celular nos propusimos identificar las proteínas acetiladas de *T. cruzi*, caracterizar el Factor con Bromodominio 1 (TcBDF1) y dos lisina deacetilasas de la familia Sir2 (sirtuinas, TcSIR2RP1 y TcSIR2RP3).

En este trabajo se identificaron por primera vez proteínas acetiladas (150) en *T. cruzi*, distribuidas entre los distintos compartimentos celulares e involucradas en una amplia variedad de funciones. Como era de esperar, el número de proteínas acetiladas en *T. cruzi* es más cercano al de *Toxoplasma* y *Plasmodium falciparum* que al de células de mamíferos o plantas. A pesar de que el número de proteínas acetiladas detectadas depende de la profundidad del análisis, los datos presentados sugieren fuertemente que la acetilación es una modificación crítica encontrada en todos los reinos y que hay una presión selectiva para mantener esta actividad aún después de una adaptación a vida parasitaria.

TcBDF1 se expresa en todos los estadios del ciclo de vida, pero presenta una expresión diferencial, siendo más abundante en el estadio infectivo (tripomastigotes) que en lo replicativos (epimastigotes y amastigotes). En epimastigotes, se concentra en los glicosomas, dirigido por una señal de transporte peroxisomal tipo II (PTS-2). La sobreexpresión de la proteína salvaje produce epimastigotes con morfología aberrante que

casi no se replican, pero los tripomastigotes sobreexpresantes son más infectivos. Por otro lado, la sobreexpresión de la proteína con una doble mutación puntual en el sitio de unión de la lisina acetilada, no es deletérea para el crecimiento de epimastigotes.

Los resultados obtenidos nos permiten proponer que TcBDF1 forma parte de un complejo proteico glicosomal que participaría en la regulación de la acetilación de distintas proteínas presentes en esta organela, modulando la actividad metabólica o el importe de proteínas a la misma. Esto significaría que todos los componentes básicos de las vías de señalización por acetilación nucleares también estarían presentes en el citoplasma y en el glicosoma.

TcSIR2RP1 es una proteína citoplasmática que presenta una expresión diferencial en los distintos estadios: es más abundante en los estadios replicativos que en el infectivo. Su sobreexpresión no afecta el crecimiento de epimastigotes ni su morfología, pero éstos se diferencian más eficientemente a tripomastigotes y resultan más infectivos.

TcSIR2RP3 posee una localización mitocondrial y una expresión diferencial a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi*, es más abundante en epimastigotes que en amastigotes y no se observa en tripomastigotes, al menos en las condiciones ensayadas. TcSIR2RP3 está involucrada en la respuesta al estrés oxidativo. Su sobreexpresión modifica el crecimiento de epimastigotes pero no afecta su morfología ni su tasa de metaciclogenesis. La capacidad infectiva de los tripomastigotes se ve levemente disminuída pero la tasa de duplicación de los amastigotes intracelulares aumentada.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la actividad de las sirtuinas es importante para la proliferación de las formas replicativas, para la interacción huésped-parásito y para la diferenciación entre los distintos estadios, pero cada una está involucrada en diferentes procesos. Actualmente, está en auge el desarrollo de inhibidores de deacetilasas por su potencial para el tratamiento de enfermedades infecciosas y no infecciosas. Nuestros resultados contribuyen al conocimiento de la localización y función de estas enzimas y las cepas sobreexpresantes de sirtuinas contruídas en este trabajo pueden ser herramientas útiles para ensayar inhibidores de sirtuinas con fines terapéuticos.

INTRODUCCION

TRYPANOSOMA CRUZI

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado perteneciente al Reino Protista, Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, Género *Trypanosoma*, Subgénero *Schizotrypanum* y Especie *cruzi*.

Todos los miembros del orden Kinetoplastida están caracterizados por la presencia de una estructura peculiar que los define, llamada kinetoplasto. Entre los Kinetoplastidos, se reconocen varios géneros que incluyen trypanosomas de vida libre (por ejemplo, *Proleptomonas*), parásitos de invertebrados (*Crithidia* y *Leptomonas*, entre otros), parásitos de plantas e invertebrados (por ejemplo, *Phytomonas*), y parásitos de vertebrados e invertebrados (como *Trypanosoma* y *Leishmania*). Estos últimos géneros incluyen a las especies parásitas del hombre, y por consecuencia son las más estudiadas.

CLASIFICACION

La variabilidad del genoma de *T. cruzi* y la diversidad de genotipos y fenotipos de esta especie ha sido ampliamente descrita a través de los años y se han definido distintos subgrupos siguiendo criterios ecológicos y epidemiológicos. Actualmente, la especie *T. cruzi* se clasifica en seis unidades de tipificación discreta (DTUs) [1]. En 2009, estas DTUs fueron renombradas como TcI-TcVI [2]. *Trypanosoma cruzi* es básicamente una población clonal, refiriéndose el término clonal en este contexto a la estructura de la población y no a su sistema de propagación. Esto no quiere decir que la recombinación está totalmente ausente en las poblaciones de este parásito, pero es un mecanismo raro que no rompe con el patrón prevalente de clonalidad. Se ha reportado que existieron eventos de recombinación genética entre DTUs de *T. cruzi* y que existirían mecanismos, aún desconocidos, de intercambio de material genético; pero la especie considerada como un todo presenta todas las características de una estructura poblacional clonal. Dado que *T. cruzi* es predominantemente diploide y su mecanismo de replicación es la fisión binaria (proceso asexual), las nuevas DTUs evolucionan por acumulación de mutaciones discretas que no serían afectadas por eventos raros de intercambio genético. Sin embargo, existe evidencia de heterocigosidad en este parásito. Esto se descubrió al estudiar genes aislados y se vio que es muy pronunciada en aislamientos naturales de TcV y TcVI, lo que sugiere que estas DTUs son híbridas que derivaron a partir de TcII y TcIII. El resto de las DTUs muestran una homocigosidad alélica sustancial (Revisado por [3]).

ENFERMEDAD DE CHAGAS

Un gran número de especies de la familia Trypanosomatidae constituyen agentes de enfermedades de importancia médica y veterinaria. Entre estas enfermedades se encuentran el Mal de Chagas (tripanosomiasis americana), la enfermedad del sueño (tripanosomiasis africana) y las leishmaniasis.

La Enfermedad de Chagas es una zoonosis muy compleja que está presente en casi todo el territorio americano, desde Estados Unidos de Norteamérica hasta el sur de Argentina y continúa representando una grave amenaza para los países de la región. Esta enfermedad, asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda, se encuentra ampliamente difundida, principalmente en las áreas rurales de todo el continente latinoamericano. Afecta a 15 millones de personas y 24 millones más están en riesgo (World Health Organization, <http://www.who.int/en/>).

La progresión natural de la Enfermedad de Chagas involucra una fase aguda que es seguida por una fase indeterminada asintomática, en la cual la infección está presente pero los síntomas crónicos aún no se han desarrollado, y en un tercio de los casos, una fase final crónica sintomática [4]. La fase aguda generalmente es asintomática, sin embargo, poco después de la infección un nódulo cutáneo local llamado chagoma puede aparecer en el sitio de inoculación y ocasionalmente puede ocasionar episodios de miocarditis. En algunos pocos casos la fase aguda puede resultar en muerte por cepas virulentas, aunque otros factores como el tamaño del inóculo, y el genotipo, edad y estado inmune del huésped pueden influir en la aparición de esta forma aguda letal [5]. Recientemente se ha sugerido denominar a la fase indeterminada como fase crónica asintomática, con el fin de considerar a todos los infectados con *T. cruzi* como enfermos crónicos de Chagas, sintomáticos o no.

El reservorio natural de *T. cruzi* lo constituyen armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos y primates silvestres, además de ciertos animales domésticos; y es transmitida al hombre comúnmente por triatominos hematófagos como *Triatoma infestans*, comúnmente llamado vinchuca, el cual transmite el parásito cuando defeca sobre la picadura que él mismo ha realizado para alimentarse (62a Asamblea Mundial de la Salud, 20 de marzo de 2009, Organización Mundial de la Salud, <http://www.paho.org/>). Otras vías de transmisión de la enfermedad pueden ser: transplacentaria (Enfermedad de Chagas congénita), transfusional, por trasplante de órganos, oral (a través de la ingesta de alimentos contaminados con las formas infectivas del parásito) y accidental (por manipulación de sangre contaminada o animales infectados). Recientemente, se reportaron un alto número de transmisiones por vía oral mayormente en la región amazónica [6].

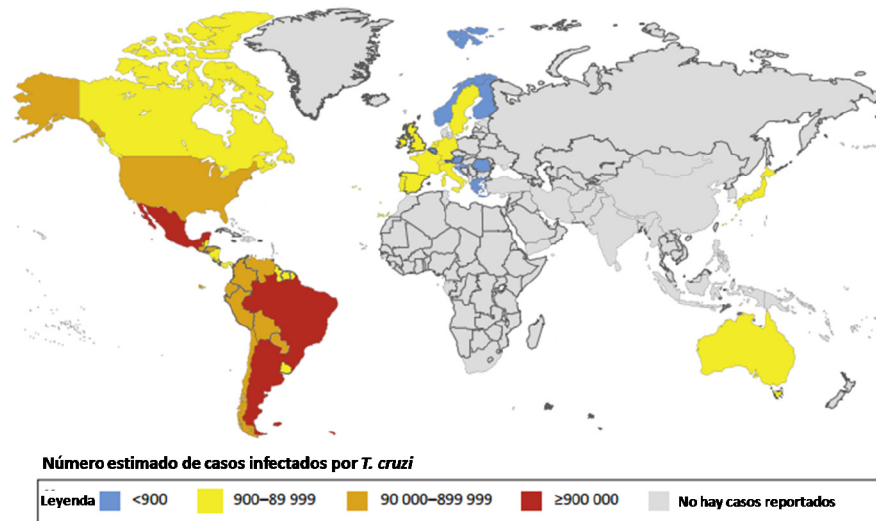


Figura 1: Distribución global de la Enfermedad de Chagas basada en estimados oficiales 2006-2010. Adaptado de [7].

Como ya se mencionó, *T. cruzi* presenta una importante variabilidad poblacional e infecta 150 especies de 24 familias de animales domésticos y silvestres, además del hombre. La estrategia de control de la enfermedad está basada en la interrupción de la transmisión vectorial y en el tamizado sistemático de sangre de donadores en todos los países endémicos; en la detección y tratamiento de la transmisión congénita y en la administración de tratamientos a los casos agudos y a los niños. Estas intervenciones han contribuido a la interrupción de la transmisión en amplias regiones del continente. Brasil, Chile y Uruguay, fueron declarados países libres de transmisión por *Triatoma infestans* con la consecuente disminución en la incidencia de casos humanos. En Argentina, actualmente nueve provincias son consideradas libres de transmisión vectorial. Es importante destacar que la transmisión no se limita a los países en los que la enfermedad es endémica, debido a los movimientos migratorios de personas que se encuentran infectadas y a la falta de control sobre los productos sanguíneos en los países donde no hay transmisión vectorial del parásito. Los casos reportados en países previamente considerados libres de la enfermedad han aumentado, por ejemplo en Japón y Australia (Figura 1).

En la actualidad no existe una vacuna contra *T. cruzi*, y los únicos dos medicamentos disponibles que se encuentran en el mercado hace más de 40 años (benznidazol y nifurtimox), son sólo parcialmente efectivos, además de que presentan serios efectos secundarios. En el último reporte sobre la Enfermedad de Chagas del grupo de trabajo científico de la Organización Mundial de la Salud, se recomienda que se deben implementar y reforzar las investigaciones sobre el mal de Chagas, principalmente en el desarrollo de nuevas herramientas de vigilancia y en su implementación, en los aspectos sociales y

económicos, en la patogénesis, en el diseño de nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento, en nuevos blancos terapéuticos y medicamentos, entre otros aspectos (World Health Organization, <http://www.who.int/en/>).

MORFOLOGIA Y ESTADIOS EVOLUTIVOS

Trypanosoma cruzi es un organismo unicelular que presenta un flagelo que emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar. Su forma y el largo del mismo varían a lo largo del ciclo de vida. Su núcleo presenta una organización estructural similar a la de otras células eucariotas y mide aproximadamente 2,5 μm .

Mediante microscopía óptica se pueden diferenciar tres formas evolutivas principales: amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes (Figura 2), teniendo en cuenta la forma general, la posición relativa entre el flagelo y el núcleo, la localización del bolsillo flagelar y del flagelo libre.

Amastigotes: poseen forma redondeada (3-6 μm), con el kinetoplasto en forma de barra o bastón en la región anterior del núcleo y el flagelo corto (no visible al microscopio óptico) que apenas emerge del bolsillo flagelar. Esta forma replicativa es intracelular, se halla en el interior de las células de hospedadores vertebrados infectados y se puede obtener por infección de células en cultivo (Figura 2A).

Tripomastigotes: poseen aspecto fusiforme (20-25 x 2 μm), con el kinetoplasto redondeado localizado en la región posterior del núcleo. El flagelo emerge del bolsillo flagelar en la zona posterior del parásito y se adhiere a lo largo del cuerpo del parásito a través de una membrana ondulante, volviéndose libre en la región anterior. Esta forma es altamente infectiva, no replicativa y puede ser encontrada en la porción posterior del intestino del insecto vector (tripomastigotes metacíclicos), en la sangre y el espacio intercelular de los hospedadores vertebrados (tripomastigotes sanguíneos) y también pueden obtenerse a través de cultivos de células infectadas ó en cultivo axénico (metaciclogénesis *in vitro*) (Figura 2B).

Epimastigotes: poseen aspecto fusiforme (20-40 μm de largo), con el kinetoplasto en forma de barra o bastón localizado en la región anterior al núcleo. El flagelo emerge del bolsillo flagelar con abertura lateral, y recorre adherido la porción del cuerpo del parásito, volviéndose libre en la región anterior. Es la forma replicativa en el tubo digestivo del insecto vector y puede ser mantenido en cultivos axénicos (Figura 2C) [8].

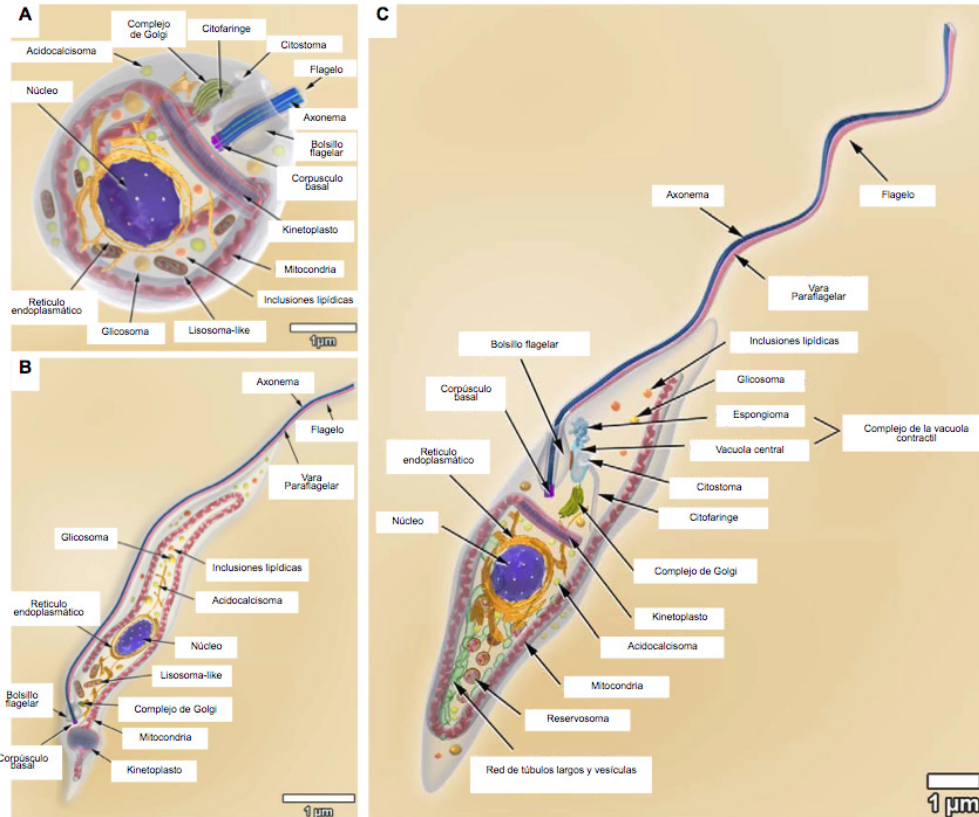


Figura 2: Representación de las diferentes formas de *T. cruzi*. A) Amastigotes B) Tripomastigotes. C) Epimastigotes. Se indican las organelas y estructuras celulares más importantes. Adaptado de [9].

CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *T. cruzi* fue elucidado hace un siglo por el médico brasileño Carlos Chagas. Se trata de un ciclo de vida complejo con estadios intracelulares y extracelulares y alternancia entre dos hospedadores: un hospedador vertebrado (humanos, mamíferos salvajes tales como marsupiales o armadillos, o animales domésticos) y uno invertebrado (triatominos). Los hospedadores invertebrados pertenecen a las familias Hemiptera y Reduvidae de las que se han descrito aproximadamente 100 especies existentes solamente en el continente americano. De todas las especies conocidas, el vector más importante de la enfermedad por su hábito casi exclusivamente doméstico es el *Triatoma infestans*, perteneciente a la subfamilia Triatominae.

El ciclo de vida comienza cuando el hospedador invertebrado se alimenta de sangre infectada de un hospedador vertebrado. Durante la alimentación, los tripomastigotes presentes en la sangre del hospedador vertebrado infectado son ingeridos por el insecto. En el estómago del insecto los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes. Estos últimos se dividen repetidamente por fisión binaria en el intestino medio, y luego se adhieren a las

células intestinales. Una vez en el recto, se adhieren a la cutícula rectal, y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, los cuales son eliminados con las heces y la orina inmediatamente después que el insecto se alimenta nuevamente de sangre. De esta forma, los tripomastigotes presentes en las heces y la orina quedan depositados sobre el hospedador vertebrado al cual infectan, penetrando por heridas o membranas mucosas (Figura 3).

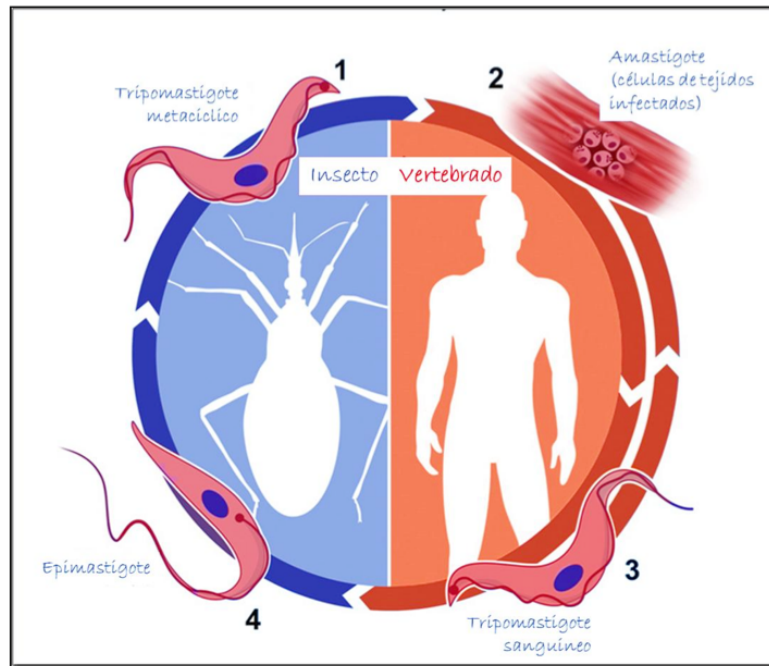


Figura 3: Ciclo de vida de *T. cruzi*. Adaptado de [10].

En los mamíferos el ciclo se inicia con la penetración de los tripomastigotes metacíclicos a diversas células, entre estas macrófagos, fibroblastos o células epiteliales, por un proceso de endocitosis. Luego de la invasión, los parásitos se encuentran en una vacuola endocítica, denominada vacuola parasitófora, donde gradualmente se diferencian a amastigotes y casi simultáneamente rompen la membrana que rodea la vacuola. Posteriormente los amastigotes se dividen en contacto directo con las estructuras citoplasmáticas. Luego de varios ciclos de división, un gran número de amastigotes pueden hallarse en el interior de las células. Un estímulo aún no caracterizado provoca la diferenciación de los amastigotes a epimastigotes intracelulares y luego a tripomastigotes sanguíneos, que se liberan al espacio intercelular por ruptura de la célula, ingresando al torrente sanguíneo o linfático. Estas formas son capaces de infectar nuevas células y amplificar la infección en el hospedador vertebrado. El ciclo vuelve a comenzar cuando un insecto se alimenta de sangre infectada del hospedador vertebrado [11] [8].

CARACTERÍSTICAS INUSUALES

Los tripanosomátidos representan una de las primeras ramas evolutivas del linaje eucariota. Además de un ciclo de vida complejo, poseen varias particularidades:

I. El kinetoplasto y una única mitocondria.

El orden Kinetoplastida, al que pertenece *Trypanosoma cruzi*, incluye un grupo de protozoos definido por la presencia de una organela característica, el kinetoplasto, el cual es un arreglo complejo de ADN dentro de una gran mitocondria que se extiende por todo el cuerpo celular. Esta red de ADN representa una proporción importante del ADN total celular, ya que, dependiendo de la especie, puede contener del 10 al 20% del ADN total de la célula. Se organiza en minicírculos asociados entre sí y también a proteínas [8].

II. Transcripción policistrónica [12].

Todos los genes que codifican proteínas están organizados en grandes unidades policistrónicas bidireccionales [13]. La mayoría de los cromosomas contienen por lo menos dos PGCs (del inglés “Polycistronic Gene Clusters”). Descripto más en detalle en la sección “El Núcleo y Genética de Trypanosomas”.

III. Trans-splicing [14].

Es un evento de procesamiento de ARNs en el cual participan 2 moléculas precursoras independientes. En tripanosomátidos esta reacción intermolecular da como resultado un exón no codificante “spliced-leader” de 39-41 nucleótidos en el extremo 5’ del ARN mensajero maduro, y otro exón codificante que contiene el codón iniciador ATG con el marco de lectura completo. Descripto más en detalle en la sección “El Núcleo y Genética de Trypanosomas”.

IV. Editado de los ARNm mitocondriales.

El editado de los ARNm mitocondriales es un fenómeno único en el cual se insertan, o menos frecuentemente eliminan, uridilatos. En *T. brucei*, 12 de los 17 pre-ARNms codificados por el genoma mitocondrial están editados en muchos sitios. Algunos ejemplos son: las subunidades 3, 7, 8 y 9 de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, la subunidad 6 de la ATP sintasa y las subunidades II y III de la citocromo oxidasa [15]. Este proceso es esencial ya que es requerido para generar transcritos traducibles. ARNs cortos (50-70 nt) codificados por el genoma mitocondrial, denominados ARN guías (ARNgs), contienen la información para la modificación. Para dirigir estos eventos, el ARNg debe aparearse correctamente con el ARNm a editar. El proceso de anillado requiere la hibridación de la secuencia de anclaje 5’ en el ARNg con la secuencia de unión complementaria localizada corriente abajo del dominio pre editado. Además de la secuencia de anclaje, el ARNg contiene una región guía de aproximadamente 30-40 nucleótidos y una cola de uridinas 3’ [16].

- V. Compartimentos intracelulares especializados como el glicosoma, descrito en detalle en el Metabolismo Energético [17], y el reservosoma [18].

EL NUCLEO Y GENETICA DE TRYPANOSOMAS

La organización estructural del núcleo de *T. cruzi* y otros tripanosomátidos es similar al resto de los eucariotas. Es pequeño, mide aproximadamente 2,5 μm y tiene una membrana nuclear típica con poros de 80 nm de diámetro. Se evidencia una continuidad entre la membrana nuclear externa y el retículo endoplasmático. En células interfásicas, la cromatina se encuentra aglomerada en la periferia del núcleo, por debajo de la membrana nuclear interna. Ocasionalmente, estas masas también son encontradas en la región central del núcleo. Los cromosomas son difíciles de distinguir porque no se condensan en ningún momento del ciclo celular de *T. cruzi*. En el centro del núcleo se puede encontrar el nucleolo.

Trypanosoma cruzi posee un genoma de 60,3 Mb (Cepa CL Brener) organizado en 41 cromosomas pequeños. La finalización del genoma de los TriTryps (*T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*) confirmó que todos los genes que codifican proteínas están organizados en grandes unidades policistrónicas bidireccionales [13]. La mayoría de los cromosomas contienen por lo menos dos PGCs (del inglés “Polycistronic Gene Clusters”), que pueden ser convergentes o divergentes. La transcripción se inicia mayoritariamente a partir de las regiones de cambio de hebra divergentes. Los genes de una unidad policistrónica generalmente no codifican proteínas relacionadas funcionalmente como ocurre en los operones de las bacterias [19]. Los ARNm nucleares maduros son generados a partir de estos transcriptos primarios por “trans-splicing” y poliadenilación [20].

Debido a la transcripción policistrónica todos los genes pertenecientes a un mismo PGC son transcriptos al mismo nivel. Sin embargo, los ARNm maduros de genes adyacentes pueden presentar diferentes concentraciones o expresión diferencial en las distintas etapas. Esto se debe a que la expresión génica en tripanosomátidos está principalmente regulada postranscripcionalmente a nivel del procesamiento, la estabilidad y la traducibilidad de los ARNm.

Trans-splicing

El análisis de secuencia de ARNs mensajeros de trypanosomas ha demostrado que todos ellos (sin excepción a la fecha) presentan una secuencia común de unos 39-41 nucleótidos en su extremo 5'. Esta secuencia forma parte de la región no traducida de los mensajeros, es especie específica y no está codificada de manera adyacente al bloque génico codificador. Se ha descrito una familia génica que contiene los genes codificantes para esta

secuencia (denominada “spliced-leader” o mini exón) arreglados en tándem. Estos genes son transcritos a partir de promotores independientes y los ARNs generados son añadidos a la región 5’ de los ARNm mediante una reacción análoga al “splicing” de exones.

El “trans-splicing”, o splicing entre 2 moléculas, es un evento de procesamiento de ARNs en eucariontes donde participan 2 moléculas precursoras independientes. Fue descrito originalmente en tripanosomátidos, y después fue encontrado también en nemátodos, tremátodos y *Euglena*. En todos estos organismos la reacción intermolecular da como resultado un exón no codificante “spliced-leader” en el extremo 5’ del ARN mensajero maduro, y otro exón codificante que contiene el codón iniciador ATG con el marco de lectura completo.

En trypanosomas esta reacción es importante por 2 razones: la primera es que se reconoce a este mecanismo como la manera por la cual todos los mensajeros adquieren un “cap” en el extremo 5’ y la segunda es el hecho que el “trans-splicing” participa en el procesamiento de una molécula policistrónica de ARN, para generar ARNs de genes individuales [21-22].

METABOLISMO ENERGETICO

El metabolismo energético dentro de la familia Trypanosomatidae difiere significativamente entre las distintas especies e incluso entre las distintas formas evolutivas de una misma especie [23].

Durante su ciclo de vida, el parásito alterna entre distintos hospedadores y a su vez entre diversas regiones del cuerpo de cada hospedador, por lo que está expuesto a condiciones ambientales altamente variables. La mayoría de las transiciones involucran la diferenciación celular del parásito a formas adaptadas a las nuevas condiciones a las que se enfrenta.

La especie en la cual se han realizado mas estudios metabólicos es *Trypanosoma brucei*. Los tripomastigotes sanguíneos de esta especie son dependientes de la glicólisis (Figura 4) y no están preparados para la vida en el intestino del insecto, donde la concentración de azúcares es normalmente muy baja y la de aminoácidos, principalmente prolina y treonina, alta, ya que el sistema mitocondrial está altamente reprimido. En la sangre del hospedador mamífero, algunos tripomastigotes de *T. brucei* se diferencian a la forma “stumpy” que depende de la glicólisis pero posee un sistema mitocondrial parcialmente activo lo cual le permite sobrevivir en el intestino del insecto. Luego de la ingesta, estos parásitos se diferencian rápidamente a la forma procíclica con un elaborado sistema mitocondrial.

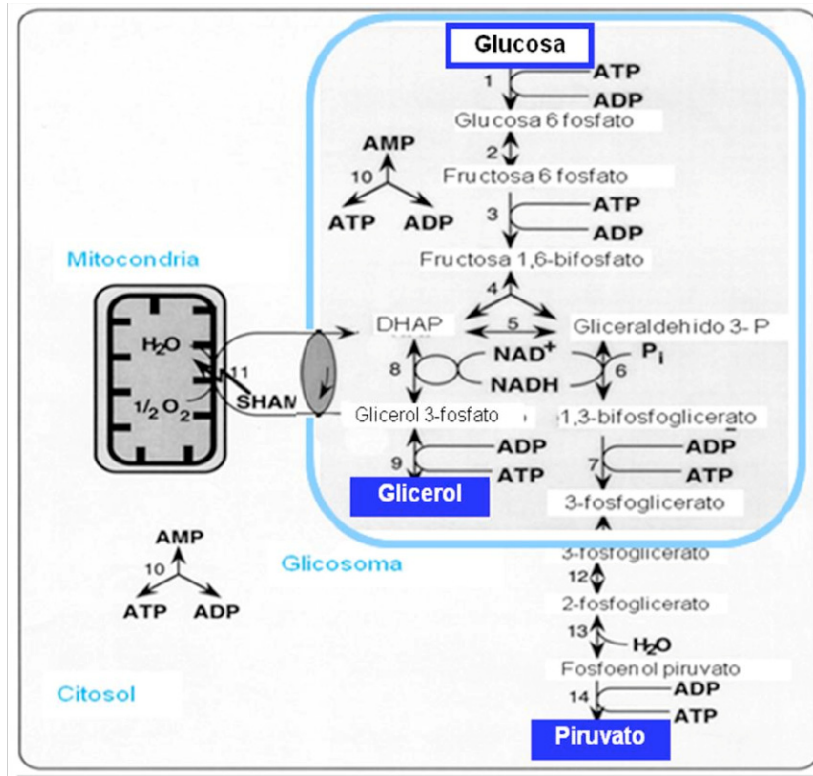


Figura 4: Representación esquemática de la glicólisis en la forma sanguínea de *T. brucei*. La glucosa es el nutriente y el glicerol y el piruvato los productos finales. Enzimas: 1, hexoquinasa; 2, fosfogluco isomerasa; 3, fosfofructo quinasa; 4, aldolasa; 5, triosafofosfato isomerasa; 6, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 7, fosfoglicerato quinasa; 8, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 9, glicerol quinasa; 10, adenilato quinasa; 11, glicerol-3-fosfato oxidasa; 12, fosfoglicerato mutasa; 13, enolasa; 14, piruvato quinasa. Adaptado de [24].

Las principales formas de *T. cruzi* poseen un metabolismo más relacionado a la forma procíclica de *T. brucei* [25], que no solo degrada glucosa, sino también aminoácidos a través de un metabolismo mitocondrial complejo, el cual involucra una cadena respiratoria con citocromos y fosforilación oxidativa para producir ATP (Figura 5) [23]. De esta manera *T. cruzi* puede usar como fuente de carbono y de energía tanto glucosa como aminoácidos [26]. Los amastigotes no toman glucosa del medio, sino que obtienen su energía principalmente a partir de aminoácidos, aunque la oxidación de ácidos grasos no puede ser excluída. Los tripomastigotes sanguíneos metabolizan la glucosa presente en la sangre del hospedador mamífero. Los epimastigotes, aunque viven en un medio en el cual la glucosa es escasa y los aminoácidos son abundantes, prefieren la glucosa por sobre los aminoácidos. Los tripomastigotes metacíclicos utilizan exclusivamente proteínas y aminoácidos como fuente de energía.

La forma sanguínea de *T. brucei* está entre las células eucariotas con mayores niveles de consumo de oxígeno, mientras que su forma procíclica, al igual que las distintas formas de *T. cruzi* y *Leishmania* presentan menores niveles de consumo [27].

El catabolismo de la glucosa puede ocurrir por glicólisis o por la vía de las pentosas fosfato. En epimastigotes de *T. cruzi* funcionan ambas vías metabólicas [28], y el balance entre ellas varía en las distintas cepas del parásito estudiadas [29]. En los parásitos crecidos en ausencia de glucosa, hay gluconeogénesis para obtener azúcares y oxidación de glucosa-6-fosfato por la vía de las pentosas fosfato para mantener la homeostasis celular del NADPH.

En *T. cruzi* la glucosa se degrada solo parcialmente a CO₂, siendo los principales productos el succinato, la L-alanina y en menor medida, el acetato, los cuales son excretados [30]. Este metabolismo peculiar fue denominado “Fermentación Aeróbica” por Theodore von Brand en 1979, para enfatizar que aunque se excretan productos fermentados, su producción se lleva a cabo en presencia de oxígeno [31].

Un rasgo distintivo de la utilización de glucosa por los trypanosomas es la ausencia de “Efecto Pasteur” [28]. En la mayoría de los organismos la transición de anaerobiosis a aerobiosis es acompañada por una rápida y considerable disminución en los niveles de utilización de glucosa. Esta inhibición de la glicólisis por oxígeno es la que se conoce como Efecto Pasteur, producto de la regulación negativa de esta vía. En los tripanosomátidos no solo no se observa este efecto, sino que, por el contrario, la utilización de glucosa es menor en condiciones anaeróbicas [32].

El Glicosoma

Otra característica sobresaliente de la glicólisis en tripanosomátidos es su compartimentalización subcelular en una organela, denominada “glicosoma” por sus descubridores Fred Opperdoes y Piet Borst en 1977.

El glicosoma es una organela citoplasmática de matriz densa y homogénea rodeada por una única membrana, perteneciente a la familia de los peroxisomas (Figura 6). Es globular, con un diámetro de 0.2 a 0.3 μm [33]. El número estimado de glicosomas va desde diez por célula en *Leishmania mexicana* [34] hasta 100 en la forma sanguínea de *T. brucei* [33]. A pesar de no poseer catalasas, comparte muchas características con los peroxisomas: ausencia de ADN, proteínas de codificación nuclear y biogénesis a través de proteínas homólogas [35].



Figura 6: Microscopía electrónica en la cual se observan los glicosomas esféricos en *T. brucei*. Adaptado de [36].

En la forma sanguínea de *T. brucei*, las primeras siete enzimas de la glicólisis, desde la Hexoquinasa hasta la Fosfoglicerato quinasa, se encuentran en el glicosoma, mientras que las últimas tres, la Fosfoglicerato mutasa, la Enolasa y la Piruvato quinasa, se encuentran en el citosol (Figura 4). Las enzimas glicolíticas comprenden hasta el 90% del contenido proteico del glicosoma, sin embargo también hay enzimas pertenecientes a otras vías metabólicas como la vía de las pentosas fosfato, la β -oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de éteres, entre otros. Debido a esta distribución de las enzimas, no hay síntesis neta de ATP en la organela, por cada molécula de glucosa se consumen y se producen dos moléculas de ATP, y el estado redox en el glicosoma también está balanceado. La síntesis neta de ATP se da en el citosol, a través de los últimos pasos de la vía.

En la forma procíclica de *T. brucei* y en otros trypanosomas como *T. cruzi*, la organización de la glicólisis es diferente: se expresa una Fosfoglicerato quinasa citosólica y enzimas adicionales, como la Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la Malato deshidrogenasa, la Fumarasa y la Fumarato reductasa, se importan al glicosoma [37]. En esta situación menos del 50% de las enzimas glicosomales son glicolíticas (Figura 5).

En el intestino del insecto vector, los aminoácidos son la fuente de energía dominante a través del metabolismo mitocondrial productor de NADH. Los electrones del NADH ingresan a una cadena respiratoria típica impulsando la generación de energía a través de la fosforilación oxidativa. En este caso, las enzimas glicolíticas funcionan en la dirección reversa como parte de la vía gluconeogénica (Figura 5) [38].

La correcta compartimentalización de las enzimas glicolíticas es esencial para el parásito al prevenir el “efecto turbo”. La regulación de la glicólisis en tripanosomátidos difiere

ampliamente de la de otros organismos, ya que hay una aparente falta de la regulación de las actividades de la Hexoquinasa y de la Fosfofructo quinasa, que se suele dar por sus productos o por otros efectores alostéricos. El catabolismo de la glucosa, así como el del glicerol, son vías autocatalíticas ya que el ATP producido impulsa el flujo. Si la glicólisis no estuviese confinada al glicosoma, la ausencia de regulación enzimática provocaría la acumulación de hexosas fosfato, lo que resultaría altamente tóxico para la célula [39]. Además, las propiedades cinéticas peculiares de las enzimas glicosomales hacen que la glicólisis solo pueda funcionar correctamente dentro de la organela, delimitada por una membrana que garantiza la existencia de un 'pool' de los cofactores NAD(H), ADP y ATP, diferente al 'pool' citosólico. De este modo, las enzimas detectarían diferentes estados redox y potenciales fosfato, dependiendo si se localizan en el citosol o el glicosoma, y consecuentemente funcionarían diferente [40].

Se ha propuesto que los glicosomas compartimentalizan gran parte de la glicólisis y gluconeogénesis para proveer al organismo una mayor flexibilidad metabólica. Esta hipótesis se basa en (1) la gran variación en el contenido de enzimas glicosomales encontrada entre tripanosomatidos y entre los distintos estadios de cada especie; (2) la presencia de vías metabólicas centrales, o parte de ellas, en esta organela; y (3) el rápido y eficiente modo por el cual glicosomas con un cierto repertorio enzimático puede intercambiarse por una nueva población de glicosomas con un repertorio diferente. Esto ocurre por autofagia de organelas redundantes y la síntesis inducida de nuevas, generando un rápido cambio de organelas que le permite a la célula adaptarse más eficientemente a nuevos nutrientes disponibles [41].

El Importe de las Proteínas Glicosomales

Contrariamente a la mitocondria, el glicosoma no posee un genoma propio, por lo que todas las proteínas presentes allí son de codificación nuclear. El importe a través de la membrana glicosomal ocurre pocos minutos después de la traducción en el citoplasma y a diferencia de la mitocondria, el cloroplasto y el retículo endoplasmático que solo importan proteínas desplegadas [42], el glicosoma importa proteínas plegadas e incluso polimerizadas [43].

Las secuencias de localización peroxisomal así como las vías de importe están ampliamente conservadas en eucariotas [44]. En células de mamíferos se identificaron varios tipos de señales de importación peroxisomal (PTS), las cuales en los últimos años también fueron identificadas en tripanosomátidos:

- Señal de importación peroxisomal tipo 1 (PTS-1): tripéptido C-terminal con la secuencia consenso [SAC]-[KRH]-[LM] [45]. En tripanosomátidos esta secuencia está

más degenerada que en mamíferos [46]. En *T. cruzi* la encontramos en la Adenilato quinasa (-CKL), en la Glicerol quinasa (-AKL), y en la Fructosa- 1,6-bifosfatasa (-SKL), entre otras.

- Señal de importación peroxisomal tipo 2 (PTS-2): nonapéptido N-terminal, es una señal bipartita con la secuencia consenso M-x(0,20)-[RK]-[LVI]-x5-[HKQR]-[LAIVFY], donde x(0,20) representa un rango de entre 0 y 20 residuos de aminoácidos. Está presente en la Hexoquinasa, en la 6-fosfogluco lactonasa y en la Serina acetiltransferasa, entre otras [47].
- Señal de importación peroxisomal interna (I-PTS): señal interna de 22 aminoácidos presente en una isoenzima pequeña de la Fosfoglicerato quinasa, en la Fosfogluco mutasa y en la Triosa fosfato isomerasa [48].

Algunas proteínas no poseen una señal de importación canónica y se propone que ingresan a la matriz peroxisomal a costa de otras proteínas que sí poseen una PTS.

La mayoría de los estudios de la biogénesis de los microsomas se llevaron a cabo en levaduras y células de mamíferos. La información disponible indica que este es un proceso conservado, con solo algunas diferencias [49]. Hasta el momento se han identificado 32 proteínas involucradas en el proceso de biogénesis de estas organelas, denominadas peroxinas, y los genes que las codifican, denominados Pex. Estas proteínas se encargan del importe a la matriz glicosomal, la inserción de proteínas en la membrana y la regulación de la proliferación de la organela.

El primer paso en el importe de las proteínas a la matriz es mediado por dos receptores citosólicos implicados en dos vías que convergen:

- Pex5: pertenece a la familia de proteínas con repeticiones de tetratricopéptidos (TPR) [50]. Presenta dos dominios, el C-terminal posee el dominio TPR y es el encargado de reconocer a la señal de importación peroxisomal tipo 1 (PTS-1), y el dominio N-terminal está involucrado en la unión a la membrana y en el reciclado [51].
- Pex7: pertenece a la familia de proteínas con repeticiones de triptófano-aspartato (WD), y reconoce la señal PTS-2 [52]. Requiere proteínas auxiliares como co-receptores: Pex18 y Pex21 en *S. cerevisiae* [53], Pex20 en *Neurospora crassa* [54] y una variante de Pex5 en plantas y mamíferos [55]. Estos co-receptores forman un complejo y lo dirigen a la membrana [56].

Una vez formado el complejo receptor-ligando en el citosol, éste debe asociarse a la membrana. Esto es facilitado por el complejo de anclaje formado por: Pex13 y Pex14, y en

levaduras también Pex17 [57]. Pex13 es una proteína integral de membrana que expone sus dominios C- y N-terminal hacia el citosol. Por su dominio C-terminal une Pex5 [58] y por el N-terminal, Pex7 [59]. Pex14 también une ambos receptores y forma una plataforma de unión para Pex17 [60].

El complejo de anclaje se asocia a otros componentes, como el complejo formado por Pex2, Pex10 y Pex12 para formar el complejo de importación [61].

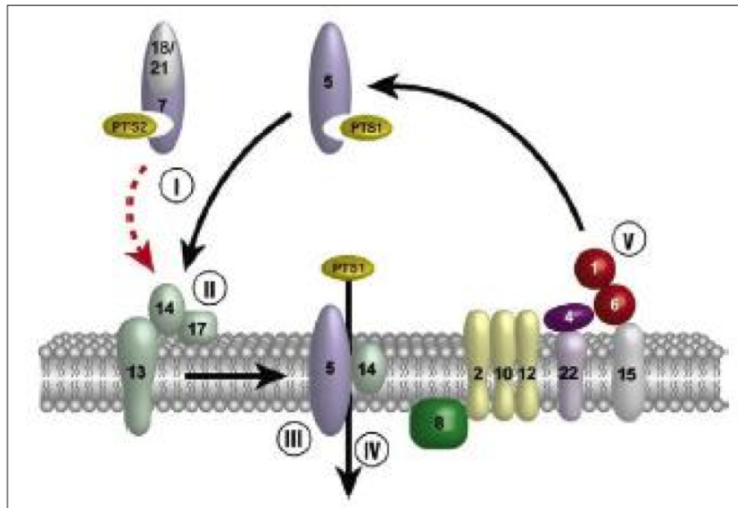


Figura 7: El importe de proteínas al peroxisoma se puede dividir en cinco etapas: (I) el receptor reconoce al ligando en el citosol, (II) el complejo receptor-ligando se une a la membrana, (III) se transloca el ligando a la matriz, (IV) se desensambla el complejo receptor-ligando y (V) el receptor se exporta nuevamente al citosol gracias a Pex1 y Pex6. Adaptado de [61].

La mayoría de los genes Pex se encuentran moderadamente conservados, con homólogos putativos presentes en organismos diversos como *S. cerevisiae*, humanos y tripanosomátidos [49]. En *T. brucei* se han caracterizado homólogos a Pex5 [62], Pex14 [63] y Pex7 [64]. En el genoma de *T. cruzi* se encuentran identificadas las secuencias codificantes para algunas peroxinas: Pex4, Pex5, Pex7 y Pex14, así como otras proteínas involucradas en la biogénesis de la organela; sin embargo dada la divergencia existente entre las peroxinas de distintos organismos no puede descartarse la presencia de otros componentes del complejo que no sean detectados por búsquedas basadas en similitud de secuencia.

ACETILACION

La acetilación de proteínas en residuos de lisinas es una modificación postraduccional (MPT) dinámica, altamente regulada y reversible. Fue inicialmente descrita en histonas hace cuatro décadas [65]. Sin embargo, no fue hasta treinta años más tarde que se descubrió la primera proteína no histona acetilada, p53 [66]. Hoy se sabe que, de los doscientos tipos de modificaciones covalentes reportadas en los eucariotas, la acetilación es la más abundante [67].

La acetilación de lisinas implica la transferencia de un grupo acetilo de la acetil coenzima A al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina [65]. Esta modificación no solo neutraliza la carga positiva de la cadena lateral de la lisina, sino que también la inhabilita para formar puentes de hidrógeno [68]. Por otra parte, también excluye a otros tipos de modificaciones, ya que de no estar acetilado, el grupo ϵ -amino puede ser modificado por metilación, ubiquitinación y sumoilación.

Diversas propiedades de las proteínas son afectadas por la acetilación: las interacciones con otras proteínas y con el ADN, la localización subcelular, la actividad transcripcional y la estabilidad. Junto con otras MPTs, la acetilación juega un papel crucial en la regulación de la estructura de la cromatina ya que participa en el establecimiento de un “código de histonas” que permite regular diferentes eventos nucleares a nivel epigenético [69]. Estas modificaciones postraduccionales ocurren en el extremo N-terminal de las histonas (H2A, H2B, H3 y H4) que tiene una secuencia altamente conservada en eucariotas. La acetilación de histonas tiende, en general, a desestabilizar la estructura de la cromatina, lo que se correlaciona con una cromatina más laxa y transcripcionalmente activa. También las MPTs generan plataformas para la unión de factores regulatorios. Estos factores interpretan este “código de histonas” y generan una respuesta que involucra la remodelación y el cambio de estado de la estructura de la cromatina [70-71]. Cada modificación puede alterar la estructura de la cromatina pero el estado global de la misma es determinado por la combinación de modificaciones. Este código complejo juega un rol preponderante en la regulación de la transcripción, el mantenimiento de la integridad del genoma y constituye, conjuntamente con la metilación del ADN, la “memoria epigenética” [72].

Las enzimas que catalizan esta transferencia covalente son llamadas Lisina Acetiltransferasas (KAT) y Lisina Deacetilasas (KDAC), originariamente denominadas Histona Acetiltransferasas e Histona Deacetilasas. El único dominio proteico capaz de reconocer lisinas acetiladas es el Bromodominio. Estos tres grupos de proteínas regulan dinámicamente el acetiloma, ya que pueden “escribir”, “borrar” y “leer” esta MPT.

EL AUGE DE LA ACETILACION

En los últimos años varios estudios demostraron la naturaleza conservada y ubicua de la acetilación de proteínas, lo que sugiere un alto poder regulatorio de esta modificación que lleva a compararla con la fosforilación de proteínas [73].

Los avances en proteómica permitieron la identificación de centenares de proteínas con lisinas acetiladas. En el 2006, Kim y colaboradores, desarrollaron un método para estudiar la acetilación de proteínas a nivel del proteoma en células HeLa. Utilizaron un anticuerpo anti-lisinas acetiladas para aislar péptidos acetilados que luego fueron identificados por espectrometría de masa de alta resolución. Este análisis les permitió la identificación de 388 sitios de acetilación pertenecientes a 195 proteínas. Estos incluyen 67 sitios en 37 proteínas citosólicas, 81 sitios en 38 proteínas nucleares y 277 sitios en 133 proteínas mitocondriales. En el 2009, Choudhary y colaboradores, identificaron 3600 sitios de acetilación de lisinas en 1750 proteínas pertenecientes a diversas localizaciones y funciones celulares. En este estudio también se observó que mientras la fosforilación ocurre principalmente en regiones no estructuradas de las proteínas, la acetilación se localiza frecuentemente en regiones con secuencias secundarias ordenadas [74]. Además, encontraron una gran variedad de complejos multiproteicos enriquecidos en lisinas acetiladas. Zhao y colaboradores determinaron el acetiloma de tejido de hígado humano; al compararlo con el proteoma total de este tejido observaron que las enzimas involucradas en el metabolismo están preferentemente acetiladas.

Desde entonces diversos grupos han usado esta aproximación para identificar el acetiloma de una amplia variedad de organismos (Tabla I).

Organismo	Sitios acetilados	Proteínas acetiladas	Referencia
Células HeLa	388	195	[75]
Células MV4-11, A549 y Jurkat	Mas de 3600	1750	[74]
<i>Homo sapiens</i>	1300	1047	[76]
<i>Escherichia coli</i>	125	84	[77]
<i>Escherichia coli</i>	138	91	[78]
<i>Salmonella enterica</i>	235	191	[79]
<i>Drosophila melanogaster</i>	1981	1013	[80]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	91	74	[81]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2878	1059	[82]
<i>Toxoplasma gondi</i>	411	274	[83]
<i>Rattus norvegicus</i>	15471	4541	[84]
<i>Vitis vinifera</i>	138	97	[85]
<i>Plasmodium falciparum</i>	421	230	[86]

<i>Thermus thermophilus</i>	197	128	[87]
<i>Erwinia amylovora</i>	141	96	[88]
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	253	114	[89]
<i>Glycine max</i>	190	121	[90]
<i>Pisum sativum</i>	664	358	[91]
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	1413	656	[92]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	226	137	[93]
<i>Synechocystis sp</i>	776	513	[94]
<i>Bombyx mori</i>	667	342	[95]

Tabla I: Acetilomas identificados.

Como se puede ver en estos múltiples trabajos, la acetilación puede regular diversos procesos celulares desde la expresión génica hasta la actividad de las proteínas. Esta modificación postraduccional puede afectar las vías de señalización y el funcionamiento de la célula. Dentro de los procesos regulados se encuentran: el procesamiento, el transporte, la integridad y la traducibilidad del ARNm, así como la actividad, la localización subcelular y la estabilidad de las proteínas.

También ha sido reportado que la acetilación de proteínas del citoesqueleto puede regular su dinámica y estabilidad. La regulación del comportamiento dinámico y del ensamblado de los filamentos que componen el citoesqueleto de una célula eucariota permite formar un enorme conjunto de estructuras a partir de tres tipos básicos de filamentos: los filamentos intermedios, que proporcionan fuerza y resistencia al estrés mecánico; los filamentos de actina, que determinan la forma de la superficie celular y son necesarios para la locomoción; y los microtúbulos, que determinan la posición de las organelas, dirigen el transporte intracelular, dan soporte estructural e intervienen en la segregación de los cromosomas. Los microtúbulos son polímeros formados por heterodímeros de tubulina- α y tubulina- β , unidas mediante enlaces no covalentes. La tubulina que forma los microtúbulos puede sufrir una serie de modificaciones postraduccionales conservadas evolutivamente. Éstas incluyen poli-glutamilación, poli-glicinación, detirosinación, acetilación, fosforilación y palmitoilación [96]. La mayoría de las MPTs están enriquecidas en microtúbulos estables y algunas no parecen afectar la dinámica del polímero. Una hipótesis reciente sugiere que las modificaciones en la tubulina generan un código que especifica funciones mediante la modificación de la estructura de los microtúbulos y/o el reclutamiento e interacción con proteínas efectoras [97]. Esta hipótesis es análoga a la hipótesis del “código de histonas”.

La acetilación de la tubulina- α ocurre en el grupo ϵ -amino del residuo de lisina 40 (K40), y ha sido reportada en todos los organismos estudiados hasta el momento, excepto en levaduras [98]. Recientemente fue identificado el complejo responsable de la acetilación de la

tubulina- α en células neuronales. Se trata del complejo Elongador, cuya subunidad catalítica es la KAT Elp3, que hasta el momento había sido reportada como responsable de la acetilación de las histonas H3 y H4 [99]. Los autores proponen que la regulación fina de la acetilación de la tubulina- α sería responsable de la maduración de las proyecciones de las neuronas corticales. Por otra parte, han sido descritas dos enzimas capaces de deacetilar tubulina- α *in vivo* e *in vitro*: HDAC6 [100] y SIRT2 (ambas en humanos), cuyo ortólogo en levaduras (Sir2) está involucrado en el silenciamiento transcripcional [101-102]. La acetilación de la tubulina- α parece estar involucrada en la estabilidad de los microtúbulos, así como también puede funcionar como sitio de unión para proteínas motoras. De esta manera regularía la dinámica del citoesqueleto.

Por otra parte, la acetilación puede afectar el metabolismo energético. Casi todas las enzimas de la glicólisis, gluconeogénesis, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, el ciclo de la urea y el metabolismo de ácidos grasos presentaron esta modificación; y como ya fue mencionado, cerca del 20% de las proteínas mitocondriales se encuentran acetiladas [75]. Al estudiar el efecto de la acetilación en enzimas pertenecientes a vías metabólicas diferentes, se determinó que esta modificación afecta directamente la actividad o estabilidad de las proteínas y que los niveles de acetilación cambian en respuesta a variaciones en la disponibilidad de nutrientes extracelulares (Tabla II), lo que da evidencia de un rol fisiológico de la acetilación dinámica en la regulación del metabolismo [76]. Más aún, los efectos de la acetilación parecen estar coordinados de modo de simultáneamente inhibir una vía metabólica mientras que activa otra.

Enzima	Efecto de la acetilación sobre la enzima	Organismo	Referencia
Fosfoglicerato kinasa	inhibe	<i>A. thaliana</i>	[81]
Malato dehidrogenasa	activa	<i>A. thaliana</i>	[81]
	activa	<i>H. sapiens</i>	[76]
Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa	inhibe	<i>E. coli</i>	[78]
	activa su actividad glicolítica, inhibe su actividad gluconeogénica	<i>S. enterica</i>	[79]
Isocitrato liasa	inhibe	<i>S. enterica</i>	[79]
Isocitrato dehidrogenasa kinasa/fosfatasa	activa su actividad fosfatasa	<i>S. enterica</i>	[79]
Aldolasa	inhibe	<i>H. sapiens</i>	[84]
Glicerol-3-fosfato dehidrogenasa	inhibe	<i>H. sapiens</i>	[84]
Fosfoenolpiruvato carboxikinasa	dirige a la proteína a ser degradada	<i>H. sapiens</i>	[76,103]
Enoil-coenzima A hidratasa/3-hidroxiacil-coenzima A	activa	<i>H. sapiens</i>	[76]
Argininosuccinato liasa	inhibe	<i>H. sapiens</i>	[76]

Tabla II: Efecto de la acetilación en enzimas del metabolismo.

ACETILTRANSFERASAS

Las Histona acetiltransferasas (HATs) o Lisina acetiltransferasas (KATs) están conservadas evolutivamente desde levaduras a humanos aunque son muy diversas en su secuencia.

La primera Histona Acetiltransferasa fue aislada hace veinte años del ciliado *Tetrahymena thermophila*, esta proteína es ortóloga al adaptador transcripcional de levadura Gcn5 (ahora llamada KAT2). Además, en la misma época se identificó a HAT1 en levaduras (KAT1), que inicialmente se postuló como una acetiltransferasa citoplasmática, si bien luego se determinó que también cumplía funciones nucleares (Revisado por [104]).

Muchas de estas enzimas tienen dominios de unión a acetil-CoA así como bromodominios y en general forman complejos multiproteicos [105]. Las KATs son diversas en estructura, especificidad de sustrato y función, y su clasificación no es tan clara como la de las deacetilasas que detallaremos más adelante. A grandes rasgos, pueden clasificarse en dos grupos o clases generales (tipo A y tipo B) dependiendo de su localización intracelular y especificidad de sustrato. El número de acetiltransferasas en el genoma humano no se conoce con exactitud debido a la baja similitud de secuencias entre estas enzimas, pero pueden clasificarse en al menos cinco familias, basadas en la divergencia de secuencia dentro del dominio KAT. Estas familias se nombran a partir de su miembro fundador:

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

Mientras que las familias HAT1, Gcn5/PCAF y MYST tienen homólogos desde levaduras hasta humanos, la familia p300/CBP es específica de metazoos y la Rtt109 es específica de hongos. Se ha determinado que la estructura del dominio acetiltransferasa se encuentra conservado en todas las familias pero que cada una tiene diferentes mecanismos de catálisis a la hora de transferir el grupo acetilo a un residuo de lisina [106].

Acetiltransferasas de Tripanosomátidos

Los tripanosomátidos presentan secuencias en su genoma que codifican para pocas acetiltransferasas, metiltransferasas y módulos de unión, como bromodominios, comparado con otros eucariotas. En particular, hay ocho secuencias codificantes para KATs que son muy divergentes de las de levadura o mamíferos y no contienen ningún dominio de unión

reconocible. Cuatro de ellas están relacionadas a la familia MYST (KAT1-4) y cuatro a la familia GNAT (Gcn5-like, AT1, ELP3a y ELP3b) [107]. En la tabla III se resumen las acetiltransferasas de tripanosomátidos y sus funciones reportadas. Hasta el momento solo se ha reportado una acetiltransferasa citoplasmática en *T. cruzi*. La misma pertenece al tipo Gcn5 y es capaz de autoacetilarse aunque no se conoce aún su sustrato [108].

KATs	Familia	Localización subcelular	Funcionalidad	Referencia
HAT1	MYST	Nuclear (<i>T. brucei</i>).	Es esencial, modula el silenciamiento telomérico.	[109]
HAT2	MYST	Nuclear (<i>T. brucei</i>).	Es esencial, acetila la histona H4K10.	[109]
HAT3	MYST	Nuclear (<i>T. brucei</i>).	No es esencial, acetila la histona H4K4.	[109]
HAT4	MYST	Citoplasmática en todos los estadios, nuclear en células post-mitóticas (<i>L. donovani</i>).	Acetila histona H4	[110]
Gcn5-like	GNAT			
AT1	GNAT	Citoplasmática en epimastigotes (<i>T. cruzi</i>).	Es capaz de autoacetilarse. No se conoce su sustrato.	[108]
ELP3a	GNAT	Periferia nuclear (<i>T. brucei</i>).	En el núcleo acetila la histona H3, en el citoplasma se encarga de modificar los nucleótidos del ARNt, controlar la exocitosis y acetilar la α -tubulina, y en la mitocondria y en los dominios ricos en actina contribuye en la organización del citoesqueleto y en la movilidad celular.	[111] [99] [112]
ELP3b	GNAT	Nucleolar (<i>T. brucei</i>).		[113]

Tabla III: Acetiltransferasas de tripanosomátidos.

DEACETILASAS

Las Histona deacetilasas (HDAC) o Lisina deacetilasas (KDAC) pueden dividirse en dos familias, la clásica o zinc-dependiente (estructuralmente relacionadas a las proteínas Hda1/Rpd3 de levaduras) y la NAD⁺ dependiente (homólogos a Sir2 de levadura). Otra clasificación divide a estas enzimas en cuatro clases según su conservación filogenética. Las clases I, II y IV son las deacetilasas clásicas (*HsHDAC1-11*), mientras que las homólogas a Sir2, referidas como sirtuinas (SIRT) representan la clase III que en humanos posee siete miembros (*HsSIRT1-7*) [114-115]. Las siete sirtuinas humanas se agrupan a su vez en cuatro clases y poseen diferentes localizaciones subcelulares. Las sirtuinas 3, 4 y 5 se localizan en la mitocondria, las sirtuinas 6 y 7 son exclusivamente nucleares, SIRT1 posee una localización dual nuclear/citosólica y SIRT2 es citosólica [116].

Sirtuinas

La deacetilasa Sir2 de *S. cerevisiae*, el miembro fundador de este grupo, es una Histona deacetilasa [117] involucrada en varios procesos relacionados con la cromatina, como el silenciamiento génico, la reparación y replicación del ADN, la estabilidad cromosómica y la segregación plasmídica. Sin embargo, actualmente se sabe, que las sirtuinas remueven el grupo aceto de lisinas de sustratos nucleares, citosólicos y mitocondriales [118]. Durante la reacción de desacetilación de Sir2, la acetil-lisina y el NAD⁺ se convierten en lisina, nicotinamida y O-acetil-ADP-ribose [119]. Muchas sirtuinas poseen además actividad ADP-ribosiltransferasa. Por ejemplo, se ha reportado que SIRT2, SIRT3 y SIRT5 de humanos cuentan tanto con actividad deacetilasa como ADP-ribosiltransferasa (Figura 8) [102,120-121].

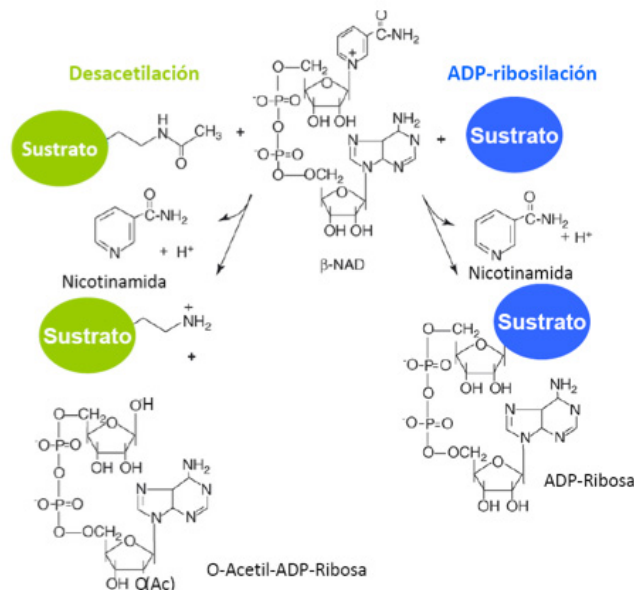


Figura 8: Esquema de las reacciones típicas catalizadas por sirtuinas: desacetilación y/o ADP-ribosilación de proteínas. Adaptado de [122].

Las sirtuinas son proteínas evolutivamente conservadas presentes en todos los reinos. Los miembros de este grupo poseen un dominio catalítico de 250 aminoácidos que presenta una identidad de secuencia que varía del 25 al 60% entre distintos organismos. Desde un punto de vista estructural, están formadas por un pliegue de Rossmann, el cual consiste en una hoja beta central formada por seis cadenas beta paralelas y varias alfa hélices que se empaquetan enfrentadas a la hoja beta; y un dominio pequeño, compuesto por tres alfa hélices y un motivo de unión a Zn²⁺ que posee dos cadenas beta antiparalelas. Su bolsillo catalítico está conservado de bacterias a mamíferos, y está formado por tres sub-bolsillos que acomodan el co-sustrato NAD⁺: el bolsillo A, une la adenina-ribosa; el bolsillo B, une la

nicotinamida-ribosa y el bolsillo C, une la nicotinamida (Figura 9). La lisina acetilada del sustrato proteico y el NAD^+ ingresan al sitio activo por lados opuestos de la hendidura entre los dos dominios. Estudios cinéticos revelaron que la lisina acetilada se une primero al sitio activo y que el NAD^+ lo hace en segundo lugar [123]. La unión de la proteína induce el cierre de la hendidura, y un “lazo de unión al co-factor” se ordena para la unión del NAD^+ . La posición de la nicotinamida del NAD^+ varía en diferentes estructuras, pero durante la formación de un intermediario alquilimidato entre la posición 1' de la ADP ribosa y el oxígeno del acetilo [124], parece ocupar un bolsillo conservado [125]. La nicotinamida luego se disocia de este bolsillo C, posiblemente asistido por el cierre del “lazo de unión al co-factor”. El intermediario se reorganiza a la forma 1'-2'-bicíclica, la cual es finalmente hidrolizada a los productos 2'-O-acetil-ADP ribosa y el polipéptido deacetilado. Si la nicotinamida se vuelve a unir al bolsillo C antes de la conversión alquilimidato, puede iniciar una reformación del sustrato que llevará a una aparente inhibición de la reacción de deacetilación [124].

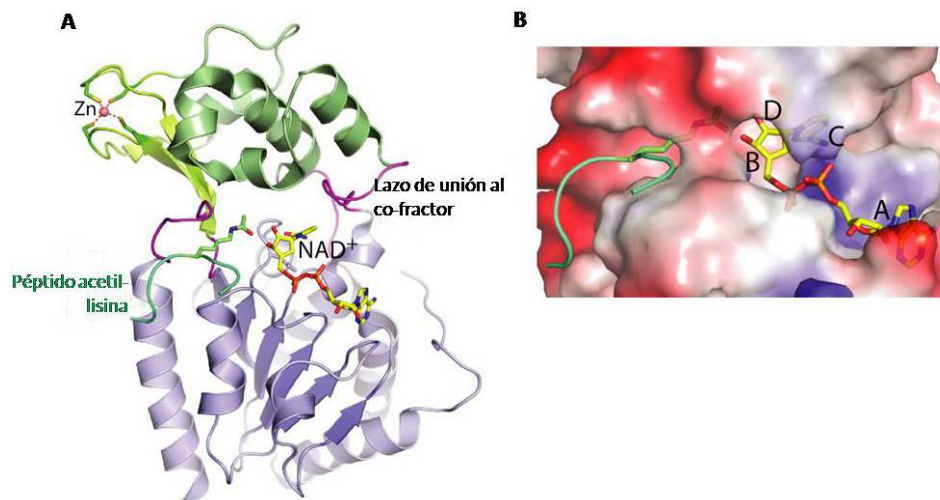


Figura 9: Esquema de la estructura de la sirtuina SchHST2. A) Estructura de SchHST2 unido a sus dos sustratos (péptido acetilado y NAD^+). Se muestra el dominio grande con plegamiento de Rossmann en azul, el dominio pequeño bilobular con el sitio de unión a Zn^{2+} en verde claro y el dominio globular en verde oscuro y los cuatro lazos de unión en violeta. B) Representación de superficie de la hendidura de unión del sustrato. Las cargas negativas están coloreadas en rojo y las positivas en azul. La región de unión del NAD^+ está dividida en los sitios A-D. Adaptado de [126].

Las sirtuinas han sido propuestas como proteínas que promueven la sobrevivencia en diversos organismos [127]. La introducción del gen Sir2 en levaduras aumenta un 30% la vida media de las mismas [128], y la sobreexpresión de la enzima en eucariotas superiores como *D. melanogaster* y *C. elegans* también aumenta su sobrevivencia [129-130]. En mamíferos, las sirtuinas están involucradas en patologías relacionadas a la edad, como las enfermedades

metabólicas, neurodegenerativas, cardiovasculares y oncológicas [131-133]. Finalmente, si bien a SIRT1 y SIRT6 se les han atribuido actividades pro-inflamatoria y anti-inflamatoria respectivamente, aún no está claro el rol que juegan las sirtuinas en la respuesta inmune [134-135]. En los últimos años se han desarrollado inhibidores farmacológicos de las sirtuinas por su potencial uso curativo en enfermedades metabólicas y oncológicas. La mayoría de los inhibidores de sirtuinas disponibles hoy, inhiben SIRT1, la sirtuina mejor caracterizada, y SIRT2.

Deacetilasas de *Trypanosomas*

En *Trypanosoma brucei* los cuatro genes que codifican ortólogos a las Lisina deacetilasas fueron identificados, clonados y caracterizados. Las deacetilasas predichas, DAC1-4, tienen un peso molecular de aproximadamente 43, 61, 75 y 64 kDa respectivamente. Comparten similitudes significativas con las lisina deacetilasas clase I (DAC1 y DAC2) y clase II (DAC3 y DAC4) de mamíferos y levaduras, y todas, excepto DAC2, poseen los residuos críticos predichos para la actividad deacetilasa. DAC1 y DAC3 parecen ser esenciales por lo cual se las considera potenciales blancos quimioterapéuticos, mientras que DAC2 y DAC4 no son requeridas para la viabilidad celular [136-137] (Tabla IV).

En cuanto a las deacetilasas clase III, se encontraron tres genes que codifican para tres sirtuinas (SIR2RP1-3). Sin embargo, SIR2RP2 no se encontró en *T. cruzi*. SIR2RP1 se relaciona a las proteínas ScSir2, HsSIRT1 y HsSIRT2, mientras que SIR2RP2 y SIR2RP3 están más relacionadas a proteínas bacterianas y a las proteínas mitocondriales humanas SIRT4 y SIRT5, respectivamente [138].

SIR2RP1 se caracterizó en varias especies de *Leishmania* (*major*, *infantum* y *amazonensis*), siendo en todas citosólica y esencial para la sobrevivencia del parásito tanto *in vitro* como *in vivo*. Su sobreexpresión retrasó la muerte celular por apoptosis en diferentes estadios del parásito [139]. SIR2RP1 recombinante de *L. infantum* fue la primera sirtuina reportada en ADP-ribosilar α -tubulina, además de deacetilarla, causando la despolimerización o la inhibición del ensamblado de la tubulina [140]. Esta proteína además de ser citosólica, co-localiza con la red de microtúbulos y parece ser excretada al igual que LaSIR2RP1 y LmSIR2RP1 [141-142]. Como se detalla en la tabla IV, las tres sirtuinas de *T. brucei* fueron caracterizadas: TbSIR2RP1 se localiza en el núcleo donde participa de la reparación del ADN así como de la transcripción mediada por la ARN polimerasa I, se asocia a regiones subteloméricas silenciando genes a sólo 2kb de los telómeros [143] y posee actividad ADP-ribosiltransferasa [144]; TbSIR2RP2 y TbSIR2RP3 son mitocondriales. Hasta el trabajo realizado en esta tesis, nada se sabía sobre las sirtuinas de *T. cruzi*.

KDACs	Clase	Localización subcelular	Funcionalidad	Referencia
DAC1	I	Estadío específica: en la forma sanguínea se concentra en el núcleo, en las formas presentes en el vector se relocaliza en el citoplasma (<i>T. brucei</i>).	En la forma sanguínea, actúa como antagonista del silenciamiento telomérico basal. Esencial para la viabilidad.	[137] [136]
DAC2	I	Predominantemente citoplasmática (<i>T. brucei</i>).	DAC2, si se sintetiza, puede no poseer actividad deacetilasa, ya que no presenta los residuos críticos necesarios.	[136]
DAC3	II	Nuclear en todos los estadios del ciclo de vida (<i>T. brucei</i>).	Actúa como represor transcripcional, es requerida para el silenciamiento del promotor VSG ES. Esencial para la viabilidad	[137] [136]
DAC4	II	Predominantemente citoplasmática (<i>T. brucei</i>).	Es requerida para la progresión del ciclo celular.	[136]
SIR2RP1	III	Citoplasmática en los estadios promastigote y amastigote (<i>L. major</i>).	Acetila α -tubulina y posee actividad ADP-ribosiltransferasa.	[140]
		Nuclear en todos los estadios del ciclo de vida (<i>T. brucei</i>).	Participa en el silenciamiento telomérico basal y en la reparación del ADN. Posee actividad ADP-ribosiltransferasa.	[138]
SIR2RP2	III	Mitocondrial (<i>T. brucei</i>).	Podrían estar involucradas en la acetilación de la acetil-CoA sintetasa	[138]
SIR2RP3	III		y en la ADP-ribosilación de la glutamato deshidrogenasa.	

Tabla IV: Deacetilasas de Trypanosomas.

Las deacetilasas como blancos emergentes de drogas anti-parasitarias.

Existen numerosos resultados que han llevado a sugerir que, en términos generales, las sirtuinas son enzimas que influyen positivamente sobre el metabolismo celular, al punto que se las ha llamado enzimas “pro-vida”. Esta consideración ha tenido numerosas implicancias sobre el estudio de las sirtuinas en distintas patologías. Las HDACs, por ejemplo, son un blanco ampliamente validado como estrategia terapéutica para el tratamiento de cáncer. La actividad anti-proliferativa de sus inhibidores se da tanto a través de la interferencia con el remodelado de la cromatina, como mediante la alteración del estado de acetilación de proteínas no histonas claves para distintos procesos celulares [145]. El número de inhibidores de deacetilasas que son aprobados y entran al mercado para tratamiento de tumores se encuentra en aumento continuamente y sería muy importante evaluar su actividad contra distintos parásitos. Además, las sirtuinas de varios parásitos humanos (especialmente *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania*) promueven la sobrevivencia del parásito bajo ciertas condiciones y en muchos organismos están involucradas en la respuesta al estrés oxidativo. Por lo tanto, se las considera como nuevos posibles

blancos terapéuticos para lo cual numerosos científicos han comenzado a explorar las diferencias estructurales y bioquímicas entre las sirtuinas de humanos y de estos parásitos, con el objetivo de inhibir selectivamente las sirtuinas de los parásitos. Se ha demostrado que inhibidores de deacetilasas de distintas clases son efectivos contra *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* y *Trypanosoma brucei* [146-149].

Los inhibidores de deacetilasas NAD⁺-dependientes utilizados en este trabajo son: Nicotinamida (NAM), Cambinol y EX-527. El Cambinol es un compuesto β-naftol que inhibe *HsSIRT1* y *HsSIRT2* con valores de IC₅₀ similares: 56 y 59 μM. Compite con el sustrato y no con el dominio de unión de NAD⁺, lo cual puede explicar su selectividad y baja toxicidad. El Cambinol posee actividad antitumoral *in vivo* [150]. EX-527 (6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-carbazol-1-carboxamida), ocupa el sitio de la nicotinamida y un bolsillo vecino y contacta con la ribosa del NAD⁺ o del co-producto 2'-O-acetil-ADP ribosa, de este modo estabiliza la conformación cerrada de la enzima evitando la liberación del producto. EX-527 inhibe 100 veces más fuertemente a *HsSIRT1*, con un IC₅₀ de 0.09 μM, que a *HsSIRT2* y *HsSIRT3* [151]. La Nicotinamida es una vitamina del complejo B, soluble en agua, junto con el ácido nicotínico pertenece a la vitamina B3 o PP y actúa como constituyente de los co-factores de la enzima NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) y NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Estas moléculas funcionan como transportadores de electrones en el metabolismo de los hidratos de carbono. La NAM se usó para tratar la osteoartritis, la pelagra y está siendo ensayada clínicamente por su potencialidad de prevenir la recurrencia del cáncer y la diabetes tipo 1. Esta vitamina es segura para humanos aún administrada a altas dosis (6 gramos/día) [152]. Soares y colaboradores demostraron las propiedades anti-trypanosoma de la nicotinamida. El crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas Y y Colombiana se vió inhibido por NAM en cultivos axénicos, los valores de IC₅₀ fueron: 37 y 25 μM, respectivamente. También disminuyó la infección de tripomastigotes y la duplicación de amastigotes [153]. El alineamiento de secuencia de las sirtuinas de *T. cruzi* y *HsSIRT1* sugiere que a pesar de la homología hay suficientes diferencias en la secuencia aminoacídica del dominio catalítico que puede usarse en la evaluación de esta proteína como blanco putativo para el desarrollo de drogas. Además, un análisis *in silico* estructural y de superficie de las sirtuinas de trypanosomas y humanos sugiere la presencia de diferencias estructurales importantes en el sitio de unión del inhibidor, indicando que la selectividad de un inhibidor por una proteína es posible [154]. Sacconnay y colaboradores realizaron un análisis *in silico* estructural de SIR2RP3 de *T. cruzi* y *Leishmania* mediante modelado por homología y simulaciones de unión y dinámica molecular, y evaluaron las diferencias de estas proteínas con las sirtuinas mitocondriales de humanos. Mediante esta técnica

identificaron diferencias menores pero significativas entre HsSIRT5 y SIR2RP3 de los parásitos que pueden servir para el desarrollo de compuestos con propiedades inhibitorias y especie-específicas [155]. El mismo grupo también realizó el modelado de TcSIR2RP1 y ensayó por simulación de unión molecular una librería de cincuenta compuestos naturales y diversos, con actividad demostrada contra este parásito, contra ambas sirtuinas. De este modo identificaron un número limitado de compuestos extraídos de *Vismia orientalis*, *Cussonia zimmermannii*, *Amomum aculeatum* y *Anacardium occidentale* que potencialmente interaccionan con las sirtuinas de *T. cruzi* [156].

BROMODOMINIOS

El bromodominio, es un dominio proteico de unión a lisina acetilada, descrito en proteínas de unión a histonas que poseen esta modificación [157]. Este dominio fue reportado por primera vez en la proteína Brahma de *Drosophila melanogaster*, y representa un módulo evolutivamente conservado presente mayoritariamente en proteínas de localización nuclear. La estructura del bromodominio fue determinada mediante cristalografía de rayos X y RMN a partir de distintas proteínas de mamíferos y levaduras, mostrando, en todos los casos, una configuración atípica de cuatro α -hélices con giro en sentido horario [158] (Figura 10).

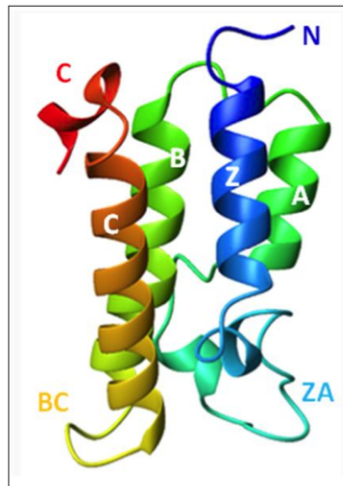


Figura 10: Estructura tridimensional del bromodominio.

Las hélices (α Z, α A, α B y α C) se encuentran separadas por dos lazos que interaccionan entre sí a través de aminoácidos hidrofóbicos, dando estabilidad estructural al motivo y generando un bolsillo hidrofóbico, el sitio de unión para la lisina acetilada, que se ubica del lado opuesto a los extremos carboxilo y amino terminal.

Si bien los bromodomios de distintas especies varían notablemente en su estructura primaria, un número limitado de aminoácidos implicados en la unión a acetil-lisina se encuentran altamente conservados sugiriendo una estructura terciaria común para todos ellos (Figura 11). En la proteína CBP (del inglés “CREB binding protein”), por ejemplo, estos son la Y1125, la Y1167 y la N1168 (Figura 11) [159], responsables de la unión de la K20 acetilada de la H4 (Figura 12). Las mayores desviaciones estructurales entre los bromodomios se ubican en los lazos ZA y BC [157].

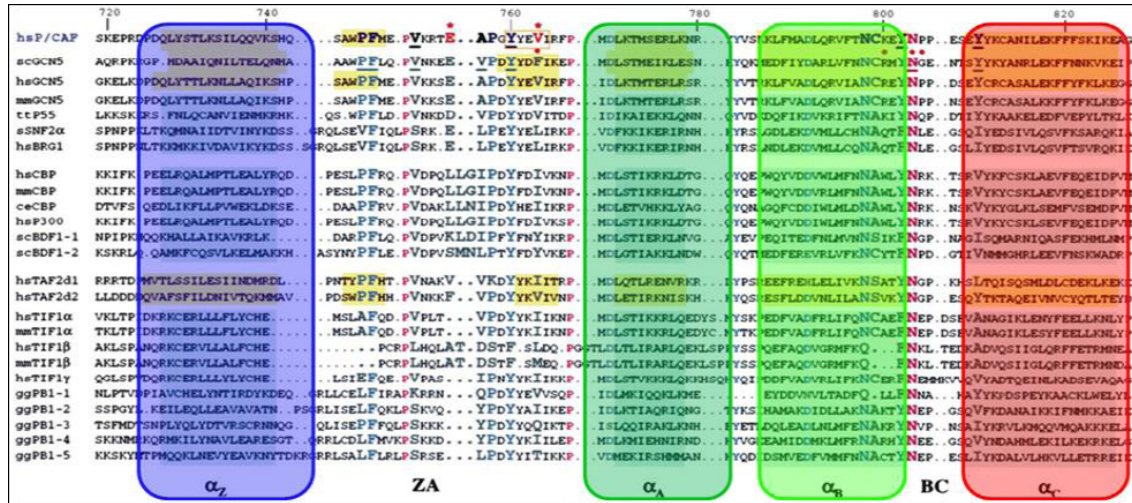


Figura 11: Alineamiento de secuencias basado en la estructura de varios bromodomios. Los residuos conservados están marcados en azul. En P/CAF los residuos que interactúan directamente con el péptido TAT están en mayúscula, y los residuos esenciales para la unión de acetil-lisina están subrayados. Los residuos importantes para la especificidad del ligando por interacción con los residuos que flanquean la acetil-lisina están marcados con asteriscos rojos. Adaptado de [157].

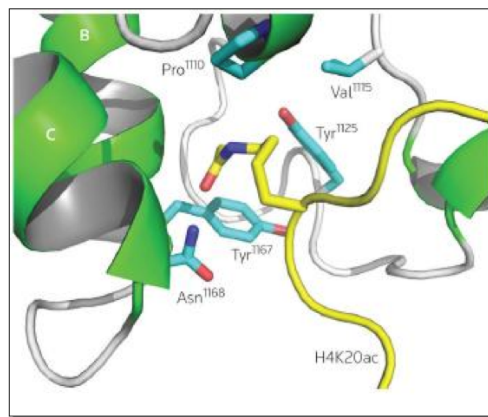


Figura 12: Base estructural del reconocimiento de la acetil-lisina en el péptido H4K20ac por el bromodominio de CBP. Adaptado de [160].

La resolución de la estructura cristalográfica de proteínas con bromodomios junto con péptidos permitió demostrar que los epítopes de acetil-lisina son reconocidos en una

cavidad central profunda e hidrofóbica donde la Ac-K es anclada por puentes hidrógeno a una Asparagina conservada presente en la mayoría de los BRDs [161] (Figura 13B).

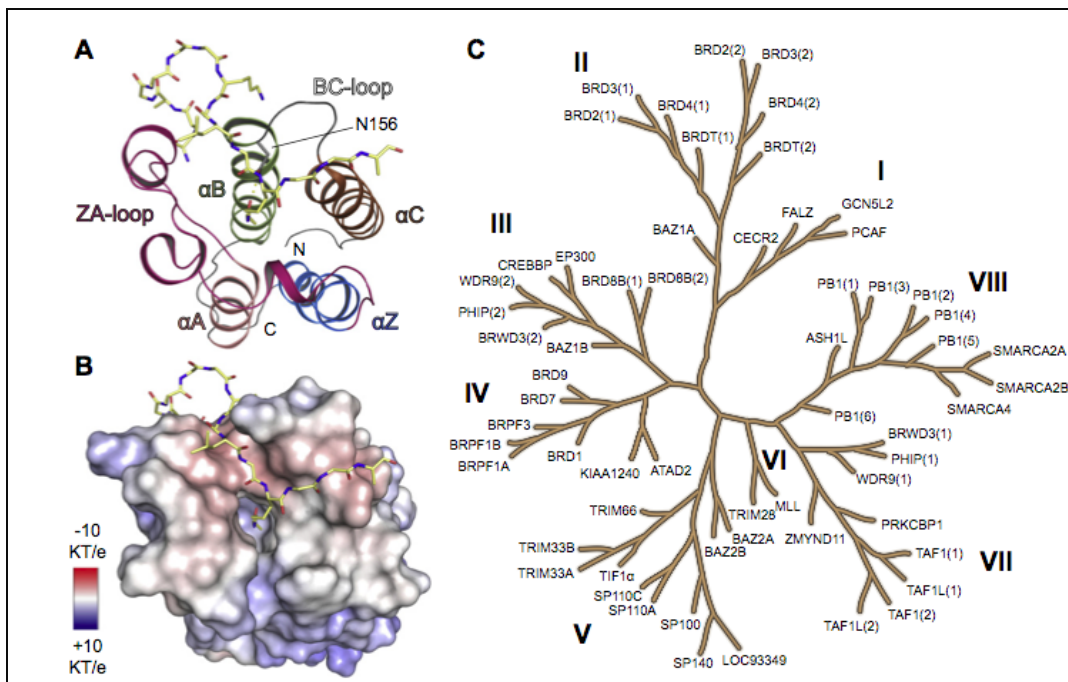


Figura 13: Plegamiento general del bromodominio, modo de unión al sustrato y filogenia. (A) Estructura general de BRD2. Están indicadas las regiones N-, C-terminal y su estructura secundaria (ID: 2DVQ). También se muestra la unión de un péptido de histona H4 acetilada en la lisina 12 (H41-15K12ac) en la cavidad central del módulo. (B) Superficie del bromodominio BRD2 (misma orientación que en A) coloreado de acuerdo a su potencial electrostático, lo que demuestra la superficie cargada alrededor de la cavidad de unión a la lisina acetilada. (C) Árbol filogenético basado en estructuras de los bromodominios humanos. Las diferentes familias se denominan con números romanos (I-VIII). Adaptado de [162].

El análisis filogenético de las familias de BRDs fuera de los dos núcleos de α -hélices centrales es complicado debido a la baja homología de secuencia y las inserciones no conservadas en las regiones de los lazos. Recientemente se clasificó los BRDs humanos en ocho familias realizando alineamientos tridimensionales basados en estructura incluyendo las estructuras obtenidas por RMN y predicciones de estructuras secundarias [162]. En la figura 13C se observa el filograma obtenido.

Familia I: contiene acetiltransferasas (HATs) como PCAF, GCN5L y también factores generales de la transcripción como FALZ, CECR2 que localizan en el núcleo. Las proteínas con bromodominios contribuyen a la acetilación específica de las histonas porque promueven el movimiento de KATs a sitios específicos en el cromosoma.

Familia II: está constituida por las proteínas BET (del inglés “bromo and extra terminal domain”), que comparten una arquitectura característica compuesta por dos

bromodominios N-terminales que tienen un alto grado de conservación a nivel de secuencia. Además, contienen un dominio extra-terminal (ET) y un dominio C-terminal más divergente. Hay cuatro proteínas en este grupo: BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT. El último miembro de esta familia solo se expresa en ovarios y testículos mientras que los otros tres se expresan ubicuamente. Las proteínas BET son reclutadas a los sitios de inicio de la transcripción durante la mitosis y se unen a sitios acetilados adyacentes con alta afinidad.

Familia III: contiene a los reguladores transcripcionales BRD8B, CREBBP, EP300, WDR9, BAZ1B, WDR3 y PHIP.

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

Familia V: este grupo está conformado por los represores transcripcionales TRIM66, TRIM33 y BAZ2A y por los reguladores transcripcionales TIF1 α , SP100, SP110, SP140 y BAZ2B. Su característica principal es la presencia de un módulo PHD/BRD en tándem que parece ser un motivo estructural necesario para el reconocimiento del péptido acetilado así como para la estabilidad de la proteína.

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

Familia VII: contiene al represor transcripcional ZMYND11, los iniciadores transcripcionales TAF1 y TAF1L y al dominio 1 de WDR9, de BRWD3 y de PHIP.

Familia VIII: está compuesta por la metil-transferasa ASH1L, los factores remodeladores de la cromatina SMARCA2 y SMARCA4 y PB1.

Reconocimiento de la acetil lisina

Dhalluin y colaboradores resolvieron la primera estructura tridimensional de un bromodominio usando RMN. La estructura fue la del factor asociado al co-activador transcripcional p300/CBP (PCAF) [158]. Como se explicó anteriormente, los BRDs comparten un plegamiento conservado de cuatro α -hélices anfipáticas con giro anti-paralelo, las cuales están unidas por dos lazos de secuencia diversa que contribuyen a la especificidad de ligando. En un extremo las regiones N- y C-terminal se acercan, mientras que en el extremo opuesto los lazos ZA y BC se empaquetan entre sí formando un bolsillo hidrofóbico que reconoce al ligando acetilado. Estos autores demostraron que los grupos metil y metileno del ligando hacían contacto con las cadenas laterales de la valina 752, alanina 757, tirosina

802, asparagina 803 y tirosina 809 de BRD2. Todos estos aminoácidos están altamente conservados entre los bromodominios (Figura 14). En este trabajo también se realizó mutagénesis sitio dirigida en la Y809, Y802, Y760 y V752 para determinar la contribución relativa de cada residuo en la unión bromodominio-acetil lisina (utilizando un péptido de histona H4 acetilado como ligando). La sustitución de la Y809 por alanina anuló completamente la unión mientras que al mutar los restantes aminoácidos se observa una reducción significativa de la afinidad (Tabla V). Los autores concluyen que la tirosina 809 es esencial para la interacción del bromodominio con el grupo acetilo y que la tirosina 802, 760 y la valina 752 de PCAF probablemente tienen roles estructurales y funcionales en el reconocimiento de la lisina acetilada.

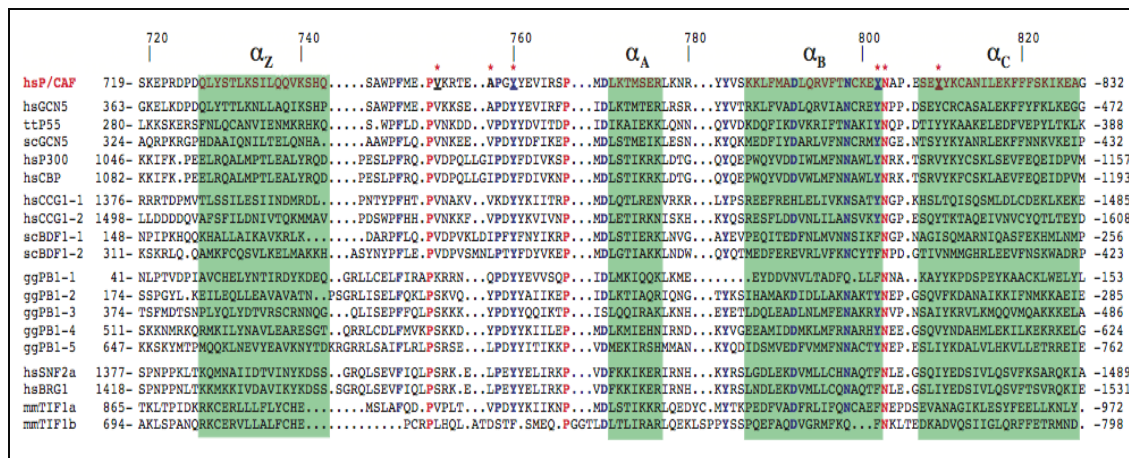


Figura 14: Alineamiento de secuencias basado en la estructura de bromodominios seleccionados. Las secuencias se alinearon en base a la estructura del bromodominio PCAF obtenida por RMN. Las alfa-hélices predichas se indican en verde. Sobre la secuencia de PCAF se indican los números de los residuos. Tres residuos absolutamente conservados se indican en rojo (Pro 751, Pro 767, y Asn 803). Residuos altamente conservados se indican en azul. Los asteriscos indican los residuos de PCAF que interactúan con el ligando utilizado, acetil-histamina, determinado por NOEs intramolecular. Los residuos subrayados fueron mutados a alanina por mutagénesis sitio dirigida. Adaptado de [158].

Mutantes PCAF	Integridad estructural del bromodominio	Afinidad por el ligando (comparada con el salvaje)
Salvaje	++++	
Y809A	++++	No hay unión
Y802A	+++	Reducción significativa
Y760A	+++	Reducción significativa
V752A	++	Reducción significativa

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

Estos resultados fueron luego confirmados cuando se cristalizó el complejo GCN5 H4KAc16 [162]. Los estudios estructurales demostraron que la acetilación es necesaria pero no suficiente para la unión efectiva del bromodominio y que los residuos aminoacídicos cercanos a la lisina acetilada permiten diferenciar los distintos ligandos y dar especificidad a la unión [163].

Las proteínas con bromodominio en general presentan además otros dominios con actividad catalítica y forman parte de complejos multiproteicos [164]. Se han descrito diversos roles para los bromodominios en procesos como:

- Acetilación de la cromatina por HATs. Gcn5, es una proteína que posee un bromodominio y es la subunidad catalítica de múltiples complejos con actividad HAT.
- Ensamblaje y remodelado de los nucleosomas. Swi2/Snf2, la subunidad ATPasa del complejo de remodelamiento de la cromatina SWI/SNF, contiene un bromodominio, el cual es importante para el reconocimiento del nucleosoma acetilado.
- Organización de cromosomas y dominios cromosomales. Las proteínas BRD, contienen dos bromodominios. BRD2, reconoce el residuo de lisina 12 acetilado de la histona H4, asociándose preferencialmente a regiones acetiladas en los cromosomas durante la mitosis; BRD4/MCAP15 interacciona con cromatina acetilada durante la interfase y la mitosis y BRD5/BRDT16 puede reorganizar la cromatina de una manera dependiente de la acetilación.
- Reconocimiento de proteínas no-histonas acetiladas. CBP posee un bromodominio que se une específicamente a la lisina 382 acetilada de p53 [68].

Inhibidores de bromodominios.

Inicialmente se pensaba que los BRDs, como mediadores de interacciones proteína-proteína, no eran buenos candidatos como blancos para el desarrollo de drogas. Esta idea fue refutada en 2005 por el grupo de Zhou, que realizó una búsqueda de inhibidores del bromodominio PCAF mediante ensayos basados en RMN [165]. Este trabajo demostró que el bolsillo de unión a acetil-lisina es sensible a la unión de pequeñas moléculas e identificó un compuesto (N1-aryl-propano-1,3-diamina) con acción inhibitoria a concentraciones micromolares. Este compuesto no se unía al BRD de la proteína de unión a CREB (CBP), por lo tanto se concluyó que existe selectividad entre la familia de bromodominios. Luego, en 2006 se reportaron inhibidores del BRD de CBP descubiertos utilizando una librería de compuestos sintetizados siguiendo el siguiente criterio: presencia de un anillo aromático conectado a un grupo $-NHCOCH_3$ directamente o a través de una cadena de dos o tres carbonos. Se postuló en este trabajo que esta combinación imitaría la unión de la acetil-

lisina al bolsillo hidrofóbico del BRD [166]. Estos trabajos iniciales demostraron que era posible desarrollar inhibidores de BRDs que bloquearan el sitio de unión a la lisina acetilada con actividad biológica relevante.

Más recientemente dos grupos, uno del Consorcio de Genómica Estructural (SGC) y otro en GlaxoSmithKline (GSK) desarrollaron independientemente inhibidores de BRDs de la familia BET (grupo II) selectivos a concentraciones nanomolares [167-168]. El grupo de SGC desarrolló el compuesto JQ1 usando como punto de partida tienodiazepinas (reportadas por Mitsubishi Pharmaceuticals como ligandos de proteínas BET). El grupo GSK desarrolló el inhibidor I-BET usando un ensayo fenotípico para identificar reguladores de la Apolipoproteína A-1. Ambos inhibidores se unen al bolsillo que aloja a la acetil-lisina y bloquean directamente la unión del bromodominio. Estos compuestos imitan las interacciones hidrofóbicas y la unión por puente hidrógeno del ligando peptídico natural. En particular I-BET presenta un anillo 1,2,4-Metriazolyl y JQ1 un anillo triazol, que imitan ambas características del péptido acetilado. La selectividad por los bromodominios de la familia BET está dada por los contactos adicionales fuera de la cavidad que aloja a la acetil-lisina aunque no se ve preferencia por miembros particulares de la familia BET. Tanto JQ1 como I-BET muestran permeabilidad celular y son eficaces *in vivo*.

La eficacia de estos inhibidores BET de primera generación disparó la búsqueda de nuevos compuestos que inhiban BRDs no-BET así como también que distingan entre los miembros de la familia BET.

El desarrollo de compuestos inhibidores de bromodominios es un campo muy activo pero hasta el momento solo los inhibidores de la familia BET encontrados son altamente efectivos. La búsqueda de compuestos del resto de las familias de bromodominios humanos recién comienza. Se ha desarrollado un recurso amigable que organiza toda esta información, el cual se denomina ChEpiMod (<http://chepimod.org/db/>) [169]. Esta base de datos tiene información sobre moduladores químicos de dominios "lectores" del epigenoma. Una búsqueda simple en esta base de datos muestra que hay reportados 196 compuestos inhibidores que actúan sobre el primer bromodominio de BRD4, 119 compuestos que actúan sobre el segundo bromodominio de BRD4, 97 compuestos sobre CBP, 60 compuestos sobre PCAF/KAT2B, 26 compuestos sobre EP300 y 12 compuestos sobre BRD2.

Los inhibidores de bromodominios han sido utilizados experimentalmente en diversas enfermedades cardiovasculares, diversos tipos de cánceres e inflamación. Además se ha reportado su uso en el área de anticoncepción masculina. En general, se observa que los inhibidores de la familia BET (JQ1, I-BET151, I-BET762) tienen efectos anti-proliferativos vía

la desregulación de la transcripción del gen MYC y otros efectos independientes de esta vía. Otra función importante de estos inhibidores es su eficacia como herramienta para investigar la función de proteínas con bromodominios en otros sistemas. La cantidad de funciones nuevas descubiertas en los últimos tres años para proteínas de la familia BET, desde que los inhibidores están disponibles, ejemplifica el poder de estos moduladores como herramienta para la biología (revisado por [170]).

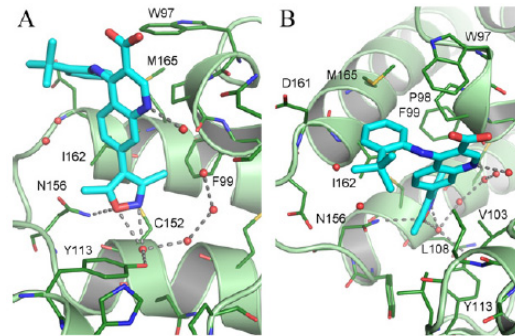


Figura 15: Vistas alternativas (A y B) de la estructura cristalina del iBET con el bromodominio N-terminal de BRD2 humano. Se indican los aminoácidos importantes para la interacción con el inhibidor. Adaptado de [171].

Uno de los inhibidores de bromodominios desarrollado por GlaxoSmithKline, el iBET-151 o GSK1210151A, fue cedido a nuestro grupo para evaluar su actividad en *Trypanosoma cruzi*. Este compuesto es un derivado de quinolina isoxazoles, interacciona con el bromodominio N-terminal de la proteína BRD2 humana y es capaz de unirse al bolsillo de reconocimiento de la lisina acetilada. En el trabajo de Seal y colaboradores se obtuvo la estructura del bromodominio N-terminal de BRD2 unida al iBET-151 mediante difracción de rayos X. Esta estructura (Figura 15) reveló que un átomo de nitrógeno del iBET acepta un puente hidrógeno del grupo hidroxilo de la tirosina 113 (Y113) de BRD2. También existe una interacción polar entre el oxígeno del isoxazol y el grupo amina de la cadena lateral de la asparagina 156 (N156). Los dos grupos metilo del iBET ocupan dos pequeños bolsillos hidrofóbicos, uno en la región de la fenilalanina 99 (F99) y otro cerca de la leucina 110 (L110). Además, el anillo quinolínico se une a una grieta hidrofóbica entre un triptófano (W97) y prolina (P98) de un lado y una leucina (L108) del otro. Ese triptófano y esta prolina son parte del motivo WPF presente en bromodominios de la familia BET. Por otro lado, el grupo 4-anilina se une a la región denominada “estante WPF” formado por las cadenas laterales del W97 y la isoleucina 162 (I162) y el grupo metileno de la asparagina 161 (N161). Se postula que la interacción lipofílica entre el estante WPF y el inhibidor contribuye a la afinidad de unión de muchos inhibidores de bromodominios BET [171]. Por ejemplo, esta interacción también se ha reportado para las benzodiazepinas [172] y las fenil isoxazol sulfonamida [173] que tienen esta actividad. Todos los residuos involucrados directamente

en estas interacciones están altamente conservados en todos los bromodominios de la familia BET.

Bromodominios de *Trypanosoma cruzi*

Previo al inicio de este trabajo de tesis, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un análisis bioinformático exhaustivo de las secuencias genómicas de *T. cruzi* no ensambladas, para la búsqueda de proteínas con bromodominios y para proteínas con dominios conservados relacionados con la regulación del inicio de la transcripción (Tesis doctoral, Pamela Cribb, 2007). Como se mencionó en la introducción, los bromodominios están asociados a proteínas involucradas en la regulación del estado de la cromatina y en la regulación transcripcional. La pregunta planteada fue si existían en el parásito proteínas con estos dominios y de ser así, si éstas podrían estar interviniendo en mecanismos similares a los reportados en otros eucariotas. Para esta búsqueda, se generó un motivo a partir de 24 proteínas con bromodominios, de distinto origen, utilizando el programa MEME. Este motivo se utilizó como anzuelo para el análisis de secuencias genómicas parcialmente ensambladas de *T. cruzi*, realizado con el programa MAST, y dió como resultado cinco secuencias codificantes con bromodominio (TcBDF1-5). Tres de los marcos abiertos de lectura hallados (TcBDF1, TcBDF2 y TcBDF3), codifican proteínas pequeñas (225 AA – 296 AA) con un alto puntaje para el dominio, y los dos restantes (TcBDF4 y TcBDF5) codifican proteínas de tamaño mayor (679 AA y 710 AA respectivamente) con bromodominios más divergentes (Figura 16). Posteriormente, cuatro de éstas secuencias, así como sus ortólogos en *T. brucei* y *L. major* fueron informadas en el proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi*, denominándose TcBDF1, TcBDF2, TcBDF3 y TcBDF4 [107]. La secuencia correspondiente a TcBDF5 no fue informada en el genoma, probablemente debido a la menor homología de secuencia que presentan los bromodominios correspondientes a esta CDS, pero fue posteriormente anotada en la base de datos TriTryps.

TcBDF2 es una proteína con bromodominio de localización nuclear y su presencia resulta esencial para la sobrevivencia de los epimastigotes en cultivo. Este es el primer factor con bromodominio caracterizado en tripanosomátidos capaz de interactuar con histonas acetiladas. En *T. cruzi*, la histona H4 se encuentra acetilada principalmente en el residuo K4 y en menor proporción en los residuos K10 y K14, los residuos con los que interactúa principalmente TcBDF2.

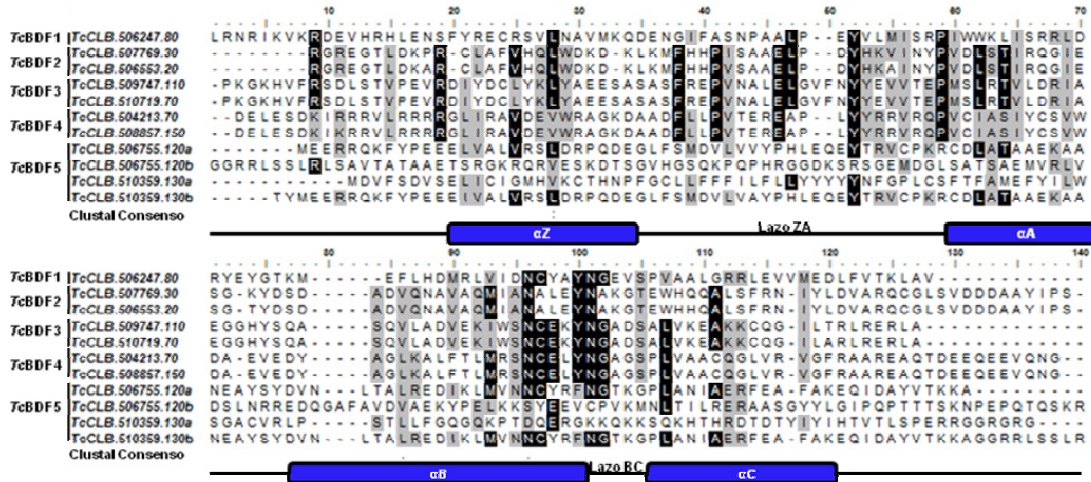


Figura 16: Alineamiento de los bromodominios de *T. cruzi* usando ClustalX2.1 y edición con BioEdit para resaltar los aminoácidos conservados e idénticos basándonos en BLOSUM 62. Los aminoácidos idénticos se indican en blanco con fondo negro y los similares en negro con fondo gris. A la izquierda de indican los números de acceso de la base de dato TryTrypDB. Hay dos alelos para cada Factor con Bromodominio, a excepción de TcBDF1. TcBDF5 posee dos bromodominios (a y b). Debajo del alineamiento está representada la estructura secundaria.

Los parásitos que expresan TcBDF2c-myc son capaces de sobrevivir a mayores dosis de radiación UV mientras que los mutantes negativos para TcBDF2 son más sensibles. Posiblemente la presencia de una mayor disponibilidad de TcBDF2 permita responder más rápidamente al reensamblado de la cromatina para poder sobreponerse a la lesión mientras que la presencia de la proteína no funcional no permita que este proceso sea llevado a cabo [174]. Estos resultados corresponden al trabajo de Tesis Doctoral de Vanina Villanova, realizado en nuestro laboratorio.

TcBDF3 es el primer bromodominio reportado que se localiza exclusivamente fuera del núcleo. Se expresa en todos los estadios del ciclo de vida del parásito, e interactúa con la α -tubulina acetilada, el componente más abundante del flagelo y los microtúbulos subpeliculares. En epimastigotes se distribuye por todo el cuerpo celular, en cambio en tripomastigotes, se concentra en el flagelo y en la región del bolsillo flagelar. TcBDF3 estaría implicado en la dinámica del citoesqueleto [175]. Mediante ensayos de atenuación de la fluorescencia se determinó que TcBDF3 recombinante, pero no una versión mutante (en los aminoácidos implicados en el reconocimiento de la lisina acetilada), se une de manera específica al inhibidor I-BET151. Además, este compuesto inhibió el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* con un IC_{50} de 5 μ M (el del Beznidazol es de 8 μ M), y no resultó citotóxico para células de mamíferos a las concentraciones ensayadas (Alonso VL et al, 2015, en revisión). Estos resultados corresponden al trabajo de Tesis Doctoral de Victoria Alonso, realizado en nuestro laboratorio.

OBJETIVOS

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

Los **objetivos particulares** son:

Estudiar la acetilación de proteínas como mecanismo de modulación de la actividad metabólica en *Trypanosoma cruzi*.

Estudiar la funcionalidad de TcBDF1 y la participación de complejos proteicos con bromodominios en la acetilación.

Caracterizar las deacetilasas NAD⁺-dependientes de *Trypanosoma cruzi*.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I: “ACETILACION EN *TRYPANOSOMA CRUZI*”

I.1. Hay diversas proteínas no nucleares acetiladas en *T. cruzi*.

Hasta el momento, con excepción de la tubulina- α , no existen reportes de proteínas no nucleares acetiladas en *Trypanosoma cruzi*. Utilizando un anticuerpo comercial anti acetil-lisina se analizaron mediante western blot extractos totales (ET), nucleares (EN) y no nucleares (EnoN), observándose la presencia de bandas reactivas en todos ellos (Figura 17A). En paralelo, lo mismos anticuerpos fueron utilizados sobre epimastigotes mediante inmunofluorescencia. Como se puede ver en la figura 17B, la señal esta presente en toda la célula, incluido el flagelo, confirmando que existen proteínas acetiladas en lisinas en todos los compartimentos celulares del parásito.

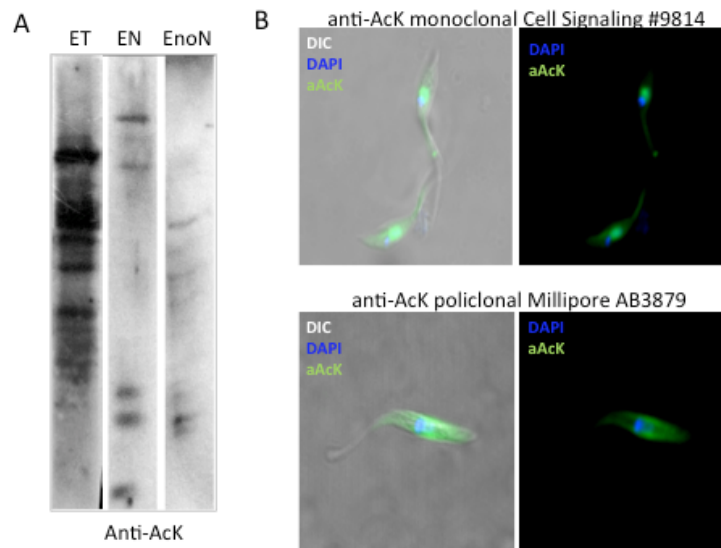


Figura 17: La acetilación es una modificación presente y abundante en *T. cruzi*. A) Western blot de extractos proteicos totales (ET), nucleares (EN) y no nucleares (EnoN) de epimastigotes con anti-Acetil Lisina (AcK). B) Detección por inmunofluorescencia en epimastigotes de las proteínas acetiladas usando dos anticuerpos anti-Acetil Lisina comerciales.

I.2. Identificación del acetiloma.

Con el objetivo de identificar las proteínas acetiladas de *T. cruzi*, utilizamos dos aproximaciones diferentes (Figura 18A y B), cuyos resultados se detallan en las tablas del Anexo.

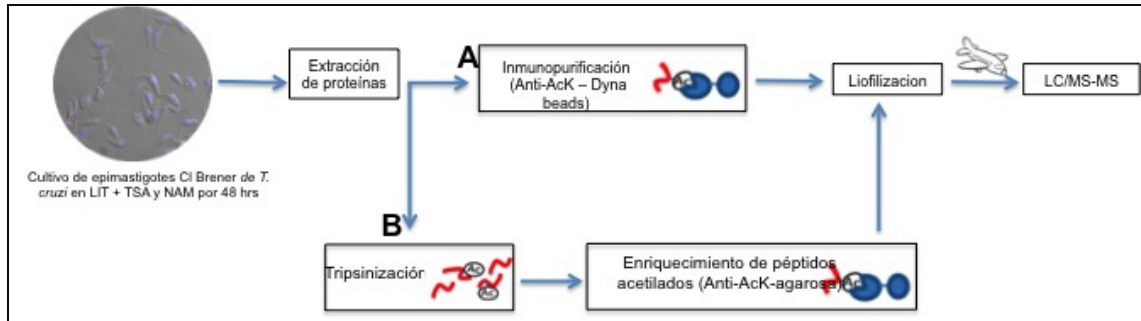


Figura 18: Representación esquemática de las metodologías utilizadas para la identificación del acetiloma. En ambos casos se partió del mismo número de parásitos tratados con TSA y NAM (inhibidores de deacetilasas) durante 48 horas, y los eluidos fueron liofilizados y enviados al laboratorio del Dr. Igor Almeida en la Universidad del Paso, Texas para su identificación por LC/MS-MS. A) Las proteínas del extracto se sometieron a inmunopurificación con anticuerpos anti-Acetil Lisina (monoclonal de Cell Signaling y policlonal de Millipore) acoplados a esferas magnéticas (Dyna Beads, Invitrogen). B) El extracto proteico se tripsinizó y los péptidos obtenidos se sometieron a inmunopurificación con anti-Acetil Lisina agarosa (ImmuneChem) de modo de obtener un eluido enriquecido en péptidos acetilados. El objetivo de esta aproximación es deshacernos de aquellos péptidos no acetilados que pertenecen a proteínas si acetiladas.

Los resultados obtenidos mediante estas dos aproximaciones son variables, lo cual es de esperar ya que se utilizaron dos anticuerpos distintos. A diferencia de la fosforilación que ocurre en una secuencia consenso, los aminoácidos que rodean la lisina acetilada son mucho más variables, dependen de la localización subcelular de la proteína así como del tipo celular y del organismo. Desafortunadamente, en pocos casos se pudo determinar la lisina acetilada dentro del péptido, sin embargo la mayoría de las proteínas detectadas también se encuentran acetiladas en otros organismos.

Como se puede observar en el diagrama de Venn (Figura 19A) utilizando la aproximación A (Figura 18) se identificaron 38 proteínas acetiladas, mientras que con la aproximación B se identificaron 127. Quince proteínas se identificaron por ambos métodos.

Una vez clasificadas las proteínas acetiladas de acuerdo a su localización celular (Figura 19B) se puede observar que están ampliamente distribuidas entre los distintos comportamientos, siendo los más poblados por proteínas acetiladas: el citosol, la mitocondria, los ribosomas, los glicosomas y el citoesqueleto. A su vez, a cada proteína acetilada se la asignó a un grupo funcional y a una función molecular, basándonos en ontología génica (GO) (geneontology.org) (Figura 19C). Las 150 proteínas acetiladas cubren una amplia variedad de funciones, con la mayoría en el metabolismo, respuesta

al estrés y degradación, traducción, y tráfico vesicular y citoesqueleto, al igual que lo observado en otros organismos.

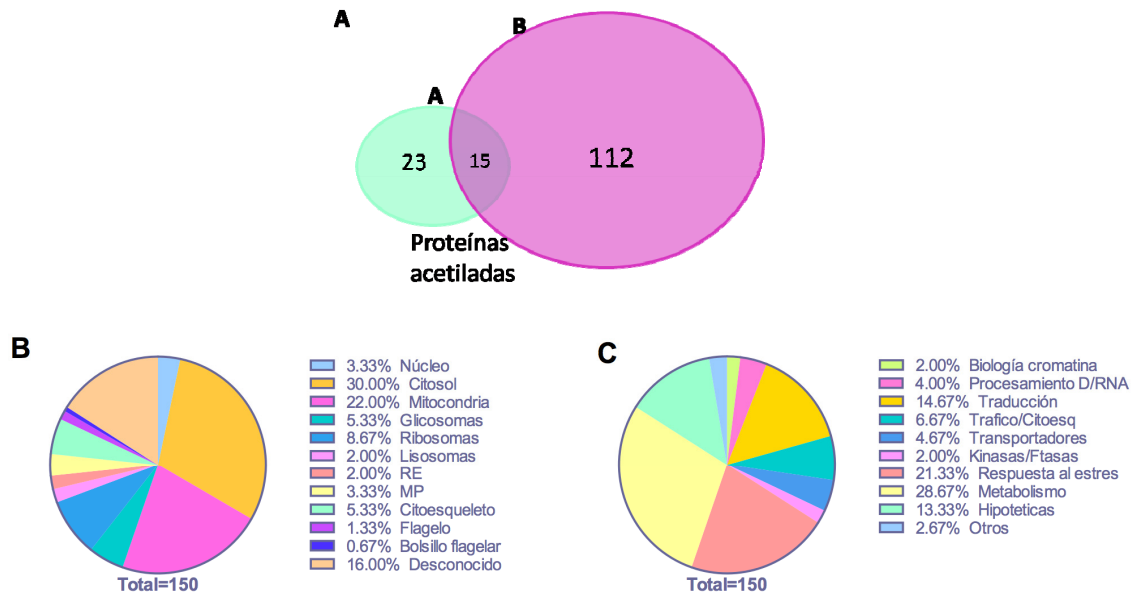


Figura 19: Resumen de las proteínas acetiladas identificadas en *T. cruzi*. A) El número de proteínas identificadas con cada aproximación usada (A y B) y su superposición se muestran en el diagrama de Venn. B) Grafico de tortas representando la distribución de las proteínas acetiladas entre los distintos compartimentos celulares y clasificadas según el proceso biológico en el cual están involucradas (C). RE, retículo endoplasmático; MP, membrana plasmática.

DISCUSION

Los acetilomas reportados de bacterias y plantas constan de aproximadamente 100–150 proteínas acetiladas, mientras que hay más de 1000 (y hasta 1700) proteínas acetiladas en *Drosophila* y humanos. El número de proteínas acetiladas en *T. cruzi* es más cercano al de *Toxoplasma* y *Plasmodium falciparum*, por lo tanto es consistente con lo que uno esperaría para un protozoo y confirman que la acetilación es una modificación post-traducciona conservada en *T. cruzi*. A pesar de que el número de proteínas acetiladas detectadas depende de la profundidad del análisis, los datos presentados sugieren fuertemente que la acetilación es una modificación crítica encontrada en todos los reinos y que hay una presión selectiva para mantener esta actividad aun después de una adaptación a la vida parasitaria [83].

Como ya se mencionó en la introducción, los diferentes estadios del parásito cambian su metabolismo energético en respuesta a los nutrientes disponibles. Por otra parte, ha sido demostrado que cambios nutricionales en diversos organismos alteran el perfil total de proteínas acetiladas y que la acetilación/deacetilación de proteínas tiene

múltiples efectos: incrementa la actividad de algunas enzimas metabólicas mientras que inhibe a otras (Tabla II). De este modo, coordina simultáneamente el flujo de varias vías metabólicas. En este contexto, teniendo en cuenta nuestra identificación del acetiloma, consideramos que la acetilación debe ser considerada una modificación post-traducciona importante en la regulación del cambio metabólico entre los diferentes estadios de *T. cruzi*. En particular dentro del glicosoma, ya que esta organela concentra gran parte de las enzimas de la glicólisis y gluconeogénesis entre otras, enzimas cuya regulación es motivo de interés ya que carecen de la típica regulación por inhibición alostérica presente en otros eucariotas.

CAPITULO II: “FACTOR CON BROMODOMINIO 1 DE *T. CRUZI*”

II.1. Análisis *in silico* de TcBDF1

A diferencia de los otros factores con bromodominios de *T. cruzi* que poseen dos variantes haplotípicas, la secuencia codificante para TcBDF1 (TcCLB.506247.80) está presente en un solo alelo. Codifica para una proteína de 295 aminoácidos, de un peso molecular calculado de 33.8 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 9.18. Cuando la secuencia se analizó con los predictores Pfam (pfam.sanger.ac.uk) y Smart (Smart.embl-heidelberg.de), ambos programas predijeron la presencia de un bromodominio en la región delimitada por los aminoácidos 30 y 115, con valores de E de $2e^{-14}$ y $8e^{-10}$, respectivamente. La mitad C-terminal de la proteína no posee similitud con ninguna otra presente en las bases de datos y puede dividirse en una región rica en glutaminas (28.5% Q) y otra rica en aminoácidos ácidos como ácido aspártico y ácido glutámico (21.8% E+D), y serinas (10.9% S). Este tipo de secuencias de baja complejidad suelen ser encontrados en zonas poco estructuradas de proteínas que participan en la interacción con otras proteínas.

En los otros TriTryps también están presentes secuencias ortólogas a TcBDF1. Su identidad de secuencia es del 44% con la de *T. brucei* (Tb927.10.8150) y de 33% con la de *Leishmania major* (LmjF.36.6880) (Figura 20A). Ninguno de los ortólogos a TcBDF1 presentes en otros tripanosomátidos ha sido caracterizado aún. Se realizaron alineamientos de las secuencias proteicas de bromodominios de distintos organismos junto con TcBDF1 (Figura 20B) y se pudo ver que los aminoácidos involucrados en la unión del residuo de lisina acetilado están conservados, lo que avala la funcionalidad del bromodominio de TcBDF1. Además, la estructura secundaria de TcBDF1 fue modelada utilizando el servidor I-TASSER [176] (Figura 20C). Se obtuvo el patrón característico de los bromodominios que consta de cuatro α -hélices conectados por dos lazos. Los aminoácidos importantes para la interacción con la lisina acetilada se encuentran dentro de los lazos que forman el bolsillo hidrofóbico, análogo a lo que ocurre con otros bromodominios que tienen sus estructuras cristalográficas resueltas.

La predicción de la localización intracelular de TcBDF1 mediante el servidor PSORT arrojó resultados disímiles. Mediante el programa Wolf (<http://wolfsort.org>), el máximo puntaje fue obtenido para localización mitocondrial tanto cuando se utilizaron parámetros de animales como de hongos. Por otra parte, el programa PSORTII (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>), predijo con mayor probabilidad una localización nuclear y en segundo término mitocondrial. También se utilizaron predictores de

organelas específicas, como MitoProt (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>), Predotar (<http://inra.fr/predotar/predotar.html>) y PeroxisomeDB (www.peroxisomedb.org/target_signal.php), siendo los dos primeros de mitocondria y el último de peroxisomas. Mientras que el programa MitoProt predijo una localización mitocondrial con un 83% de probabilidad, el programa Predotar predijo con mayor probabilidad “otra” localización. Por su parte, el servidor PeroxisomeDB reconoció dentro del extremo N-terminal, una posible secuencia de importación a esta organela, PTS-2.

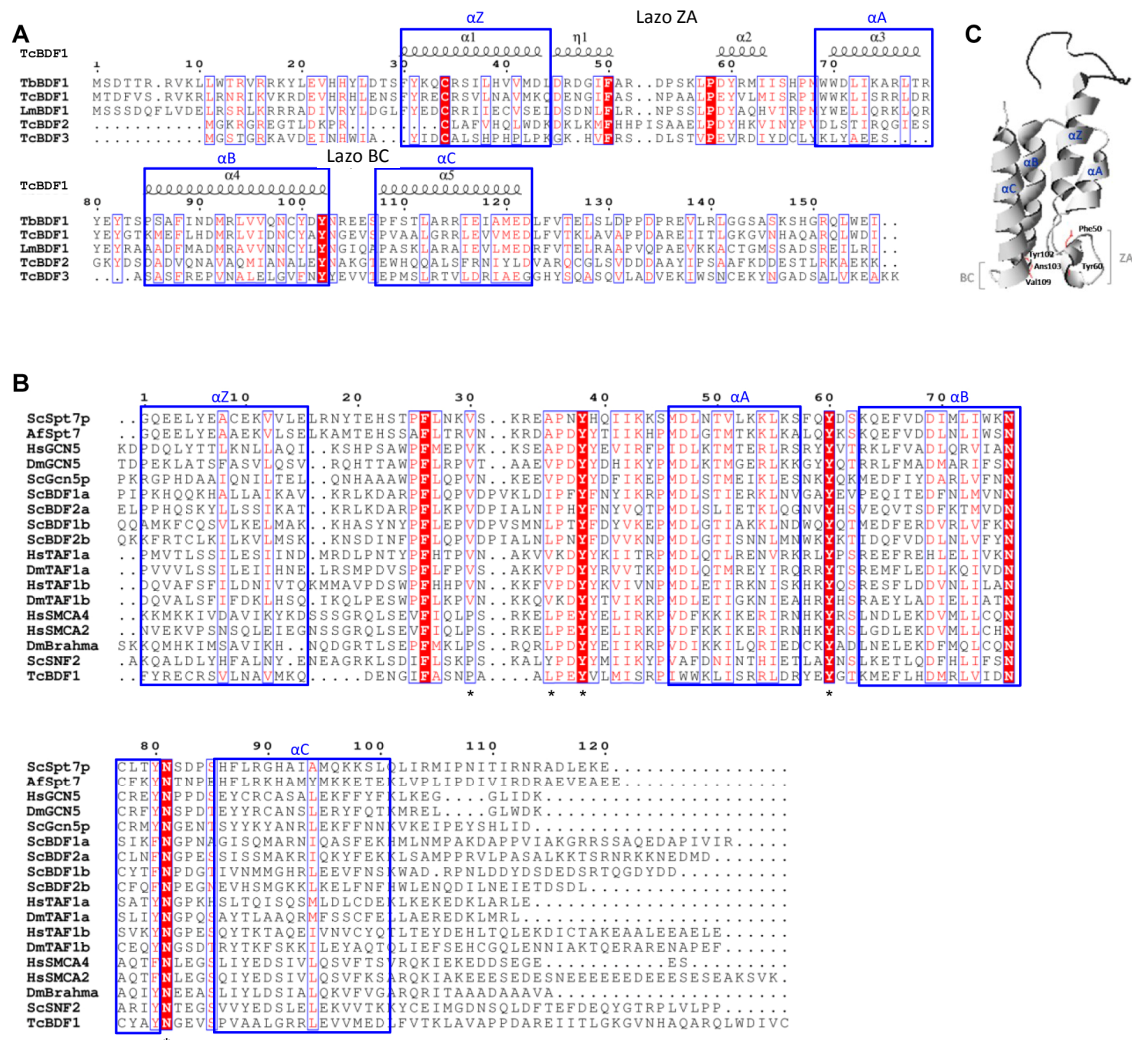


Figura 20: A) Alineamiento de TcBDF1 con sus ortólogos de *T. brucei* y *L. major*, y los dos bromodominios ya caracterizados de *T. cruzi* (TcBDF2 Y TcBDF3), junto con la predicción de la estructura secundaria (arriba). B) Alineamiento de secuencia de un número seleccionado de bromodominios de diversos organismos. Las secuencias utilizadas fueron: *DmBrahma* (*Drosophila melanogaster*; P25439), *HsSMCA4* (*Homo sapiens*; P51532), *HsSMCA2* (*H. sapiens*; P51531), *DmGCN5* (*D. melanogaster*; AAC39102.1),

HsGCN5 (*H. sapiens*; AAC39769.1), ScGcn5p (*Saccharomyces cerevisiae*; NP_011768.1), ScBDF1a y ScBDF1b (*S. cerevisiae*; P35817), ScBDF2a y ScBDF2b (*S. cerevisiae*; YDL070W), DmTAF1a (TAFII250) y DmTAF1b (TAFII250) (*D.melanogaster*; P51123), HsTAF1a (TAFII250) y HsTAF1b (TAFII250) (*H. sapiens*; P21675), ScSpt7 (*S. cerevisiae*; NP_009637.1), AfSpt7 (*Aspergillus fumigatus*; XP_754519.1), TcBDF1 (*T. cruzi*; TcCLB.506247.80). Ambos alineamientos se realizaron usando ClustalX2.1 y fueron editados con el servidor ESPript (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript>). Las α -hélices están recuadradas en azul, los residuos idénticos están en blanco con fondo rojo y los cambios conservados en rojo con fondo blanco. Los asteriscos muestran los aminoácidos importantes para la interacción con las lisinas acetiladas. C) Modelado tridimensional del bromodominio de TcBDF1. Se indican las α -hélices características del bromodominio (α A, α Z, α B y α C), los lazos ZA y BC y los aminoácidos importantes para el reconocimiento de la lisina acetilada.

Teniendo en cuenta que la secuencia consenso de la PTS-2 es M-x(0,20)-[RK]-[LVI]-x5-[HKQR]-[LAIVFY], una búsqueda más refinada muestra en el extremo N-terminal de TcBDF1 tres secuencias que podrían ser consideradas PTS-2. En la figura 21 se observa la comparación de las posibles PTS-2 de TcBDF1 con las de otras proteínas de otros organismos. El servidor PeroxisomeDB arrojó el máximo puntaje para la tercera secuencia de TcBDF1, aquella en la cual la secuencia consenso está entre los aminoácidos 18 y 26.

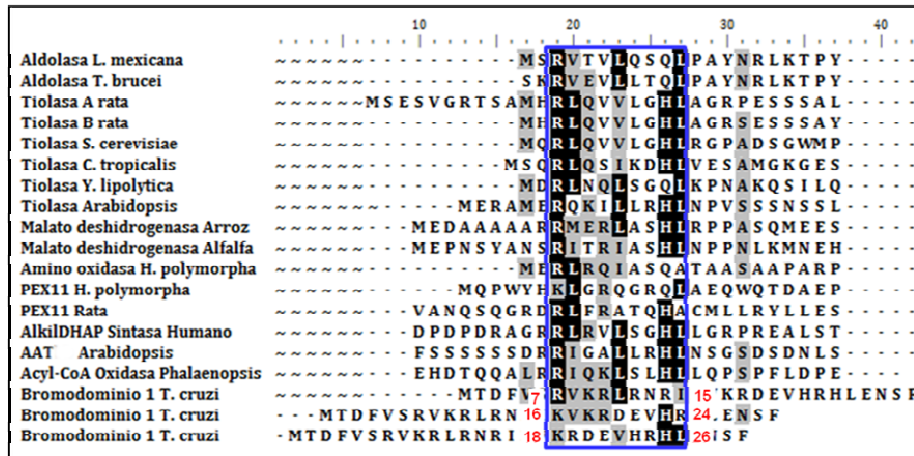


Figura 21: Alineamiento de secuencias aminoacídicas de PTS-2 de diferentes proteínas y organismos. Los aminoácidos idénticos se indican en blanco con fondo negro y los similares en negro con fondo gris. El nonapeptido consenso de PTS-2 presente en todas estas proteínas se encuentra recuadrada en azul. En rojo se indican los aminoácidos entre los que esta la secuencia. PEX11, receptor peroxina. DHAP, dihidroxi-acetona fosfato. AAT, aspartato aminotransferasa.

II.2. TcBDF1 tiene una expresión diferencial durante el ciclo de vida de *T. cruzi*.

Para verificar la expresión de TcBDF1 en los distintos estadios, realizamos inmunofluorescencias sobre parásitos fijados y se prepararon extractos proteicos totales de epimastigotes, amastigotes intracelulares y tripomastigotes y se sometieron a

western blot con los anticuerpos específicos anti-TcBDF1 (anticuerpos obtenidos y chequeados durante mi Tesina de Licenciatura). Como se puede observar en la figura 22A, TcBDF1 es mucho más abundante en tripomastigotes (estadio infeccioso) que en los estadios replicativos (epimastigotes y amastigotes). Por inmunofluorescencia (Figura 22B), se observa la expresión de TcBDF1 fuera del núcleo en todos los estadios.

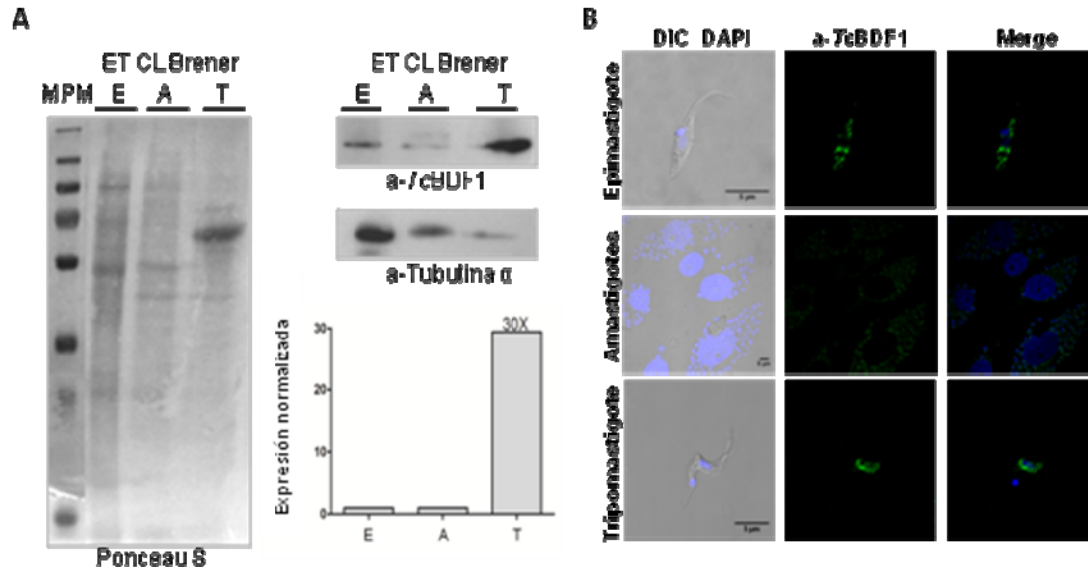


Figura 22: Expresión de TcBDF1 en los distintos estadios de *T. cruzi*. A) Extractos proteicos totales (ET) de epimastigotes (E), amastigotes (A) y tripomastigotes (T) separados en geles de policriacilamida. Tinción de la membrana de nitrocelulosa con Ponceau S y western blot con anti-TcBDF1 y anti-Tubulina α para normalizar las cantidades de proteínas. MPM, marcador de peso molecular. B) Inmunofluorescencia con anti-TcBDF1 de epimastigotes, amastigotes intracelulares y tripomastigotes. Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a FITC. El ADN del núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Imágenes obtenidas con un microscopio confocal Nikon TE-2000-E2. Barra: 5 μ m. DIC, contraste de interferencia diferencial. Merge, superposición de canales.

II.3. TcBDF1 se localiza en el glicosoma.

Dados los resultados observados en la figura 22B y los arrojados por los predictores de localización, decidimos realizar numerosas aproximaciones para confirmar la localización no nuclear de TcBDF1.

En primera instancia, se prepararon extractos nucleares y no nucleares de epimastigotes (Figura 23A), los cuales se sometieron a western blot junto con marcadores nuclear (TcBDF2) y citoplasmático (Tirosina amino transferasa, TcTAT). Se obtuvo la banda del peso molecular correspondiente para TcBDF1 en el extracto no nuclear.

A continuación, se realizaron dos fraccionamientos subcelulares: por centrifugación diferencial (Figura 23B) y con concentraciones crecientes de digitonina (Figura 23C). En el fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial, se van obteniendo secuencialmente fracciones enriquecidas en las distintas organelas por sedimentación a velocidades crecientes: N (núcleos y debris celular), GG (gránulos grandes como mitocondria), GP (gránulos pequeños, restos de mitocondria, glicosomas), M (microsomas, como glicosomas y retículo) y S (sobrenadante final). Sometimos las fracciones a western blot con anti-TcBDF1 y en paralelo con marcadores de diferentes localizaciones subcelulares: Malato deshidrogenasa (TcMDH) mitocondrial y glicosomal, Hexokinasa (TcHK) y TcTAT (Figura 23B). Se observó una señal más fuerte para TcBDF1 en la fracción enriquecida en microsomas, al igual que el marcador de glicosomas MDH glicosomal.

En el fraccionamiento con digitonina se realiza una permeabilización progresiva de los epimastigotes en presencia de concentraciones crecientes de digitonina, un glicósido que disuelve lípidos, especialmente en membranas. El método de fraccionamiento se basa en la diferencia en el contenido de colesterol de las distintas membranas celulares. Las fracciones obtenidas se analizaron por western blot con anti-TcBDF1 y los diferentes marcadores (Figura 23C). Mientras que los marcadores del citosol (TcTAT y TcBDF3) son liberados completamente a 0.08 mg digitonina/mg proteína, los glicosomales (TcHK y TcMDH glicosomal) recién comienzan a liberarse a esa concentración de digitonina, y se liberan completamente a 0.20-0.24 mg digitonina/mg proteína. Para TcBDF1 se observó un patrón similar al de la Hexokinasa y la Malato deshidrogenasa glicosomal.

Por último, realizamos ensayos de co-localización por microscopía confocal de epimastigotes inmunoteñidos simultáneamente con anti-TcBDF1 y anticuerpos contra diversos marcadores subcelulares: Tirosina amino transferasa de citosol, MitoTracker de mitocondria y Hexokinasa y GFP-PTS1 de glicosoma (en parásitos transfectados con pTEX-GFP-PTS1 [177], la GFP es dirigida a los glicosomas por la señal de transporte peroxisomal tipo 1, CKL). En todos los casos, TcBDF1 co-localiza con los marcadores glicosomales (Figura 24).

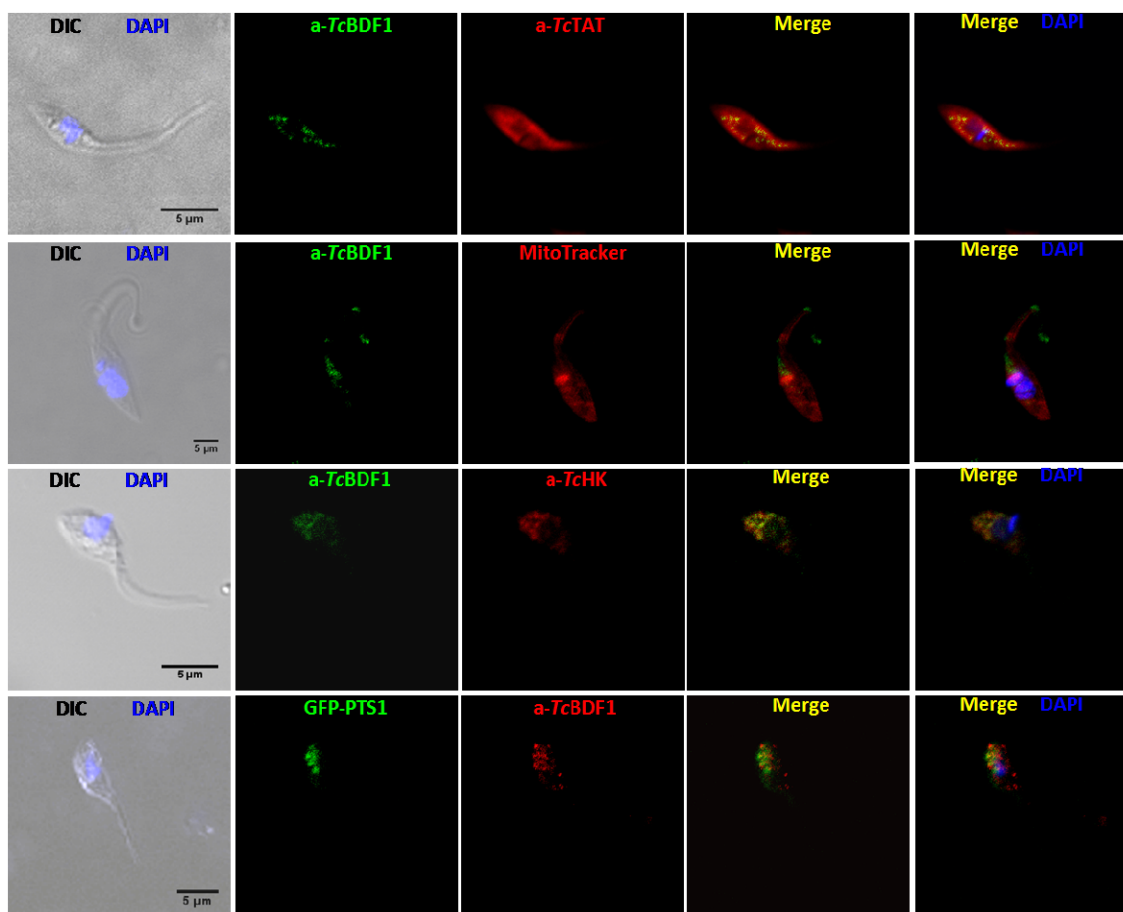


Figura 24: Análisis de Inmunoco-localización. Anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado FITC y a Cy3, y anti-ratón conjugado a Alexa555. El ADN del núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Imágenes obtenidas con un microscopio confocal Nikon TE-2000-E2. Barra: 5 μ m. DIC, contraste de interferencia diferencial. Merge, superposición de canales.

II.4. TcBDF1 es dirigida a los glicosomas por una PTS-2.

Como mencioné anteriormente, el análisis de la secuencia de TcBDF1 con el predictor PeroxisomeDB arrojó tres posibles PTS-2 presentes en su extremo N-terminal (Figura 21). Para determinar si la secuencia N-terminal del bromodominio reconocida por el servidor PeroxisomeDB como una posible PTS-2 actúa efectivamente como una señal que dirige a TcBDF1 hacia el glicosoma, se propuso expresar la proteína entera, una versión truncada, sin los primeros 27 aminoácidos, y sólo los primeros aminoácidos, como fusiones a la proteína fluorescente Cherry, utilizando el vector para expresión en *T. cruzi* pTREXmCherry [178] (Figura 25B).

Una vez obtenidos los plásmidos, fueron transfectados en la cepa CL Brener de *T. cruzi* y su expresión se analizó por microscopía de fluorescencia (Figura 25C). El patrón de fluorescencia observado en los parásitos transfectados con pTREX-*TcBDF1*-Cherry es el típico patrón punteado glicosomal, al igual que lo obtenido en las inmunofluorescencias con anti-*TcBDF1*, y en efecto en parásitos co-transfectados con pTREX-*TcBDF1*-Cherry y pTEX-GFP-PTS1, observamos co-localización de *TcBDF1* fusionada a Cherry y GFP-PTS1 (Figura 26).

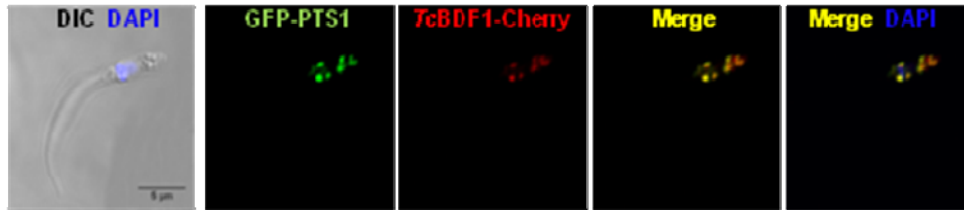


Figura 26: Microscopía confocal de epimastigotes transientes co-transfectados con pTREX-*TcBDF1*-Cherry y pTEX-GFP-PTS1. El ADN del núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Imágenes obtenidas con un microscopio confocal Nikon TE-2000-E2. Barra: 5 µm. DIC, contraste de interferencia diferencial. Merge, superposición de canales.

En el caso de los parásitos transfectados con pTREX-*TcBDF1* Δ N-Cherry la fluorescencia es más homogénea, se observa en todo el parásito y no solo en zonas puntuales. En cambio, entre los parásitos transfectados con pTREX-*TcBDF1*PTS-Cherry, se observan parásitos con fluorescencia punteada y otros con la fluorescencia distribuída más homogéneamente. Esto fue reportado para las PTS-2 de otras proteínas [179]. A diferencia de la mitocondria, el cloroplasto y el retículo endoplasmático que solo importan proteínas desplegadas [42], el glicosoma importa proteínas plegadas e incluso polimerizadas [43]. Por lo tanto, las secuencias de direccionamiento al glicosoma (o peroxisomas) requieren de una estructura tridimensional, un plegamiento, adecuado para poder funcionar correctamente. Es probable que en la fusión de sólo el PTS-2 de *TcBDF1* a Cherry se haya perdido en parte este requerimiento. Otra posibilidad es que dos secuencias sean necesarias para el importe.

II.5. Construcción de cepas sobreexpresantes para *TcBDF1*.

Con el objetivo de caracterizar funcionalmente al Factor con Bromodominio 1 decidimos realizar mutantes puntuales en aminoácidos claves para la interacción con el residuo de acetil lisina.

Para seleccionar los aminoácidos a mutar, nos basamos en un estudio realizado por Dhalluin y colaboradores mencionado anteriormente [158]. Una vez que la secuencia aminoacídica del bromodominio de *TcBDF1* fue alineada con la secuencia de PCAF

(Figura 27A) decidimos mutar los aminoácidos Y102 y V109 por alanina (A) que corresponden a las dos primeras mutaciones de PCAF (Figura 27A, indicados con flechas). Elegimos estas mutaciones ya que las mismas no generaron cambios estructurales significativos y su afinidad por el ligando (péptidos de histona H4) se vió reducida significativamente en el bromodominio humano.

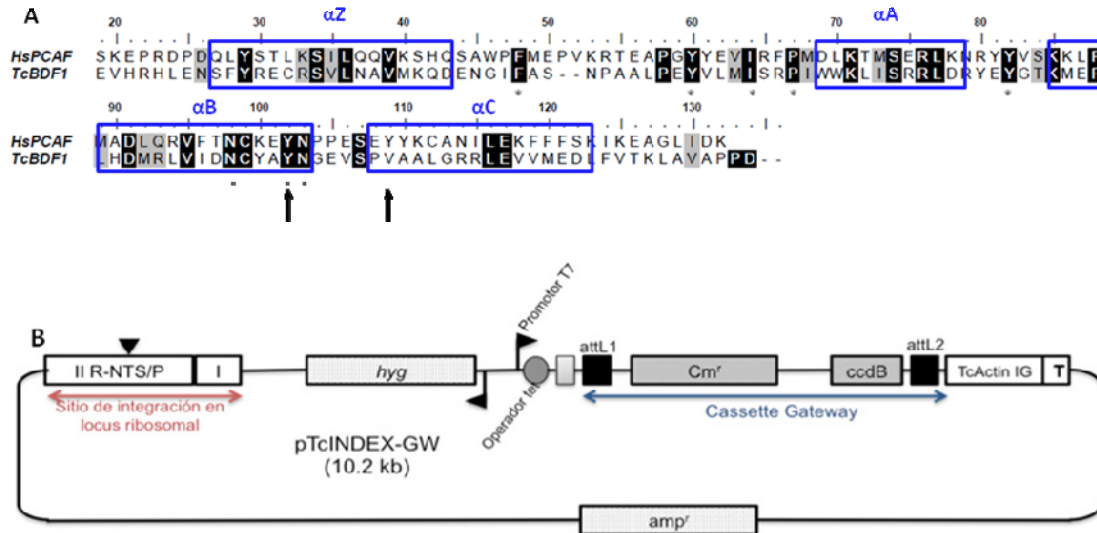


Figura 27: A) Alineamiento de los bromodominios de TcBDF1 y PCAF. En azul se recuadran las cuatro α -hélices. Los aminoácidos idénticos se indican en blanco con fondo negro y los similares en negro con fondo gris. Los asteriscos muestran los aminoácidos importantes para la interacción con la lisina acetilada y los aminoácidos mutados se señalan con las flechas. B) Mapa del vector pTcINDEX-GW. Se indica el sitio de integración en el locus ribosomal (R-NTS/P), el vector se linealiza entre los fragmentos I y II mediante una enzima de restricción (SpeI) y esto permite la integración del mismo. Hyg, resistencia al antibiótico Higromicina (selección en *T. cruzi*); ampr, resistencia al antibiótico Ampicilina (selección en bacterias); TcActina IG, región intergénica de Actina; T, terminador transcripcional T7. El rectángulo gris claro al lado del cassette Gateway indica el sitio aceptor de splicing de la proteína P2 β ribosomal. Las banderas negras indican los promotores T7, se indican también la localización del operador Tetraciclina (tet). El triángulo negro indica la localización del inicio de la transcripción de la Polimerasa I. El cassette Gateway esta formado por los dos sitios de recombinación (attL1 y attL2), un gen de resistencia a Cloranfenicol (Cmr) y el gen ccdB (gen letal que solo permite la incorporación de este vector en cepas de *E. coli* que tienen la ADN girasa mutada).

Para construir los mutantes puntuales se decidió utilizar la estrategia de ZOE-PCR (ver detalles en la sección de Materiales y Métodos). Se diseñaron los oligonucleótidos cebadores BDF1YxA Fw, BDF1YxA Rv, BDF1VxA Fw y BDF1VxA Rv, donde los codones que codifican para Y102 y V109 fueron reemplazados por codones que codifican para Alanina (A). Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen) y secuenciados. Luego se clonaron por corte y ligación en el vector de entrada del sistema Gateway (Invitrogen) pENTR3C. Por último, el fragmento de TcBDF1

con las mutaciones se transfirió al pTcINDEX-GW por recombinación. Este es un plásmido para la expresión en *T. cruzi* inducible por Tetraciclina (Figura 27B) [180].

También se generó un mutante truncado, que expresa sólo la mitad N-terminal de la proteína, conteniendo la secuencia de importe a la organela y el bromodominio. La base de esta aproximación es que la parte C-terminal de la proteína sería la responsable de su interacción con otras proteínas en un complejo multiproteico. En paralelo, se construyó el plásmido con la forma salvaje de TcBDF1. A todas estas construcciones se les fusionó en su extremo C-terminal un epítope de HA para su inmunodetección.

Los vectores construídos fueron:

- pTcINDEXGW-BDF1-HA (salvaje)
- pTcINDEXGW-BDF1Y102-HA (mutante puntual)
- pTcINDEXGW-BDF1V109-HA (mutante puntual)
- pTcINDEXGW-BDF1Y102/V109-HA (doble mutante)
- pTcINDEXGW-BDF1ΔC-HA (mutante truncado)

Con estas construcciones se transfectó la cepa CL Brener pLew13 y se seleccionó con el agregado de Higromocina. Sin embargo, solo pudimos obtener las siguientes cepas transfectadas en forma estable: CL Brener pTcINDEXGW-BDF1HA (salvaje) y CL Brener pTcINDEXGW-BDF1dmHA (doble mutante).

II.6. Chequeo de la inducción de las cepas transfectantes.

Se verificó la inducción de la sobreexpresión con Tetraciclina, por western blot de extractos proteicos totales e inmunofluorescencia (Figura 28). Como se puede observar, sólo se detectan las proteínas exógenas en presencia de Tetraciclina (28 A y C), no hay expresión de escape en los cultivos no inducidos. Además, al detectar TcBDF1 tanto endógena como exógena con anticuerpos específicos, pudimos cuantificar los niveles de sobreexpresión obtenidos con este sistema (~10X) (Figura 28B).

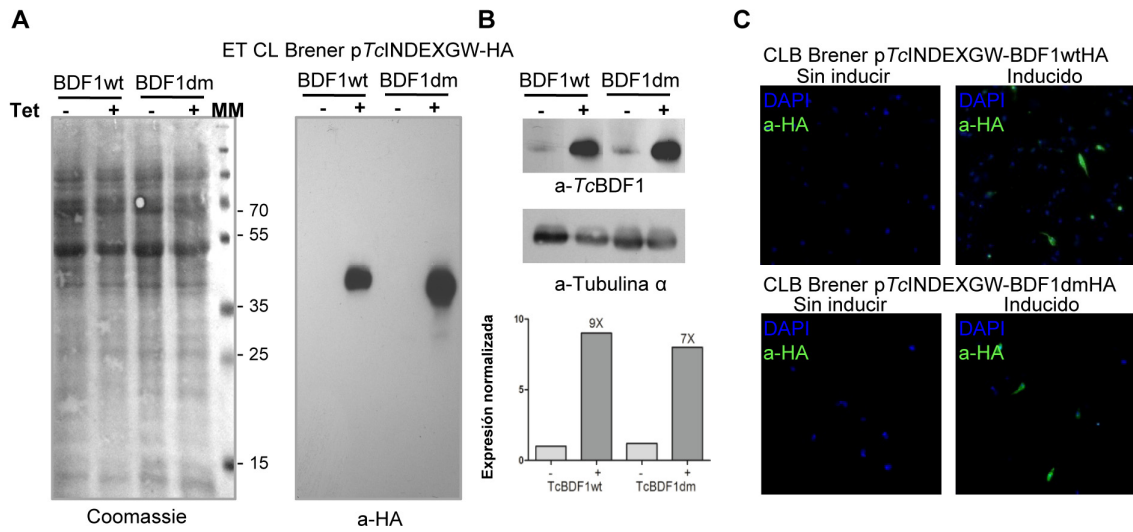


Figura 28: Chequeo de la sobreexpresión con Tetraciclina a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 16 horas. A) Gel de poliacrilamida de los extractos proteicos totales (ET) de cada cepa inducida y sin inducir, teñido con coomassie y western blot con anti-HA y con B) anti-Tubulina α y los anticuerpos específicos (anti-TcBDF1) para calcular los niveles de sobreexpresión respecto de la proteína endógena. MM, marcador de peso molecular. C) Inmunofluorescencia de epimastigotes transfectantes inducidos y sin inducir con anti-HA. Anticuerpo secundario: anti-rata conjugado a FITC. El ADN del núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Imágenes obtenidas con un microscopio Nikon NiU E300.

II.7. Análisis de la localización subcelular de TcBDF1 salvaje y mutante sobreexpresadas.

Para determinar la localización subcelular de las proteínas exógenas en las cepas transfectantes, realizamos la inducción con Tetraciclina a distintos tiempos y luego de fijar los parásitos con formaldehído los analizamos por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-HA y anti-TcBDF1 (Figura 29). TcBDF1HA salvaje se observa en el bolsillo flagelar, el flagelo y los microtúbulos subpeliculares. Esta deslocalización probablemente sea producto de los altos niveles de sobreexpresión. Para TcBDF1HA mutante a cortos tiempos de inducción se observa un patrón punteado distribuido por todo el cuerpo celular, similar a lo que ocurre con la proteína endógena. A mayor tiempo de inducción se la ve en la periferia nuclear y los microtúbulos subpeliculares.

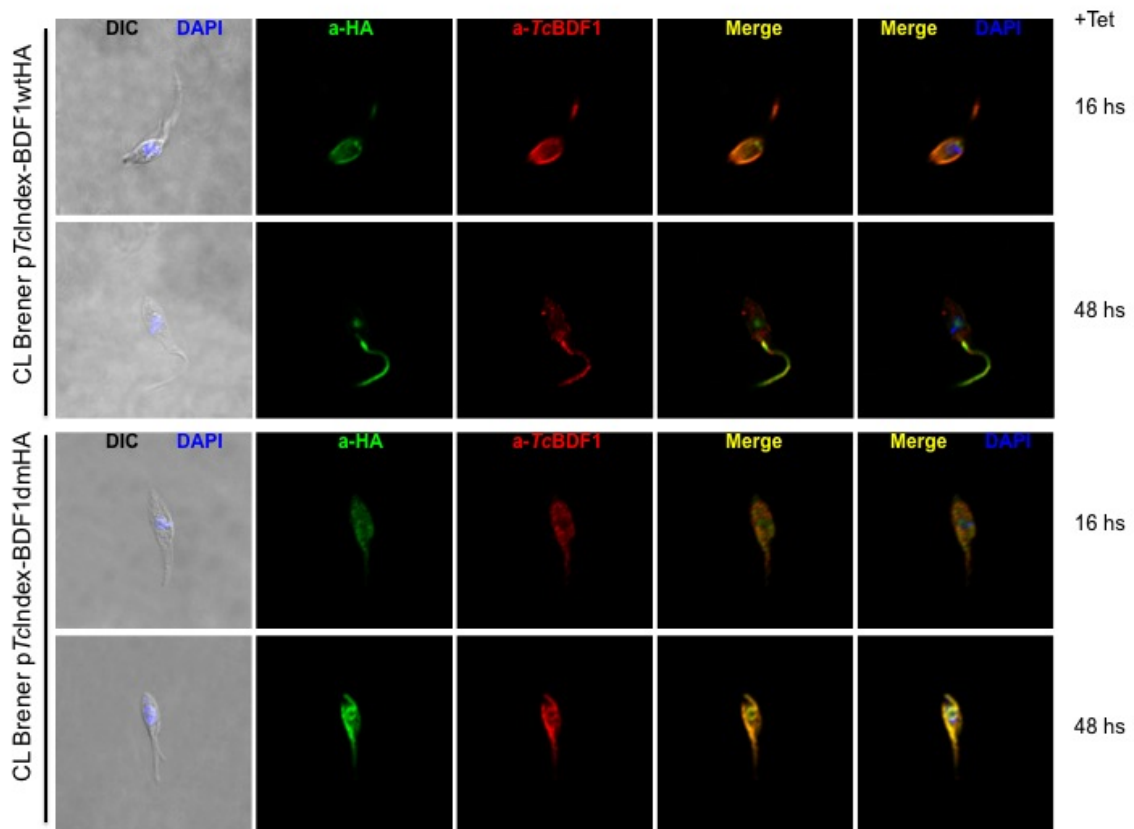


Figura 29: inmunofluorescencia de epimastigotes de las cepas transfectantes inducidas con Tet a distintos tiempos, con anti-HA y anti-TcBDF1. Anticuerpos secundarios: anti-rata conjugado a FITC y anti-conejo conjugado a Cy3. El ADN del núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Imágenes obtenidas con un microscopio confocal Nikon TE-2000-E2. DIC, contraste de interferencia diferencial. Merge, superposición de canales.

II.8. La sobreexpresión de TcBDF1 salvaje, pero NO de la doble mutante, es deletéreo para el crecimiento de los epimastigotes.

Para analizar los efectos de la sobreexpresión de TcBDF1 salvaje y mutante, realizamos curvas de crecimiento de epimastigotes en ausencia y en presencia de Tetraciclina (0.5 ug/ml) (Figura 30A). La expresión de la proteína mutante no tuvo ningún efecto sobre la duplicación de epimastigotes, pero la de la versión salvaje si, resultó muy perjudicial, observándose arresto y muerte celular. Al observar los parásitos de la cepa pTcINDEXGW-BDF1wtHA teñidos con Giemsa, exhiben morfologías aberrantes con múltiples kinetoplastos y flagelos (Figura 30B), fenotipo característico descrito para parásitos con un ciclo celular disfuncional [181].

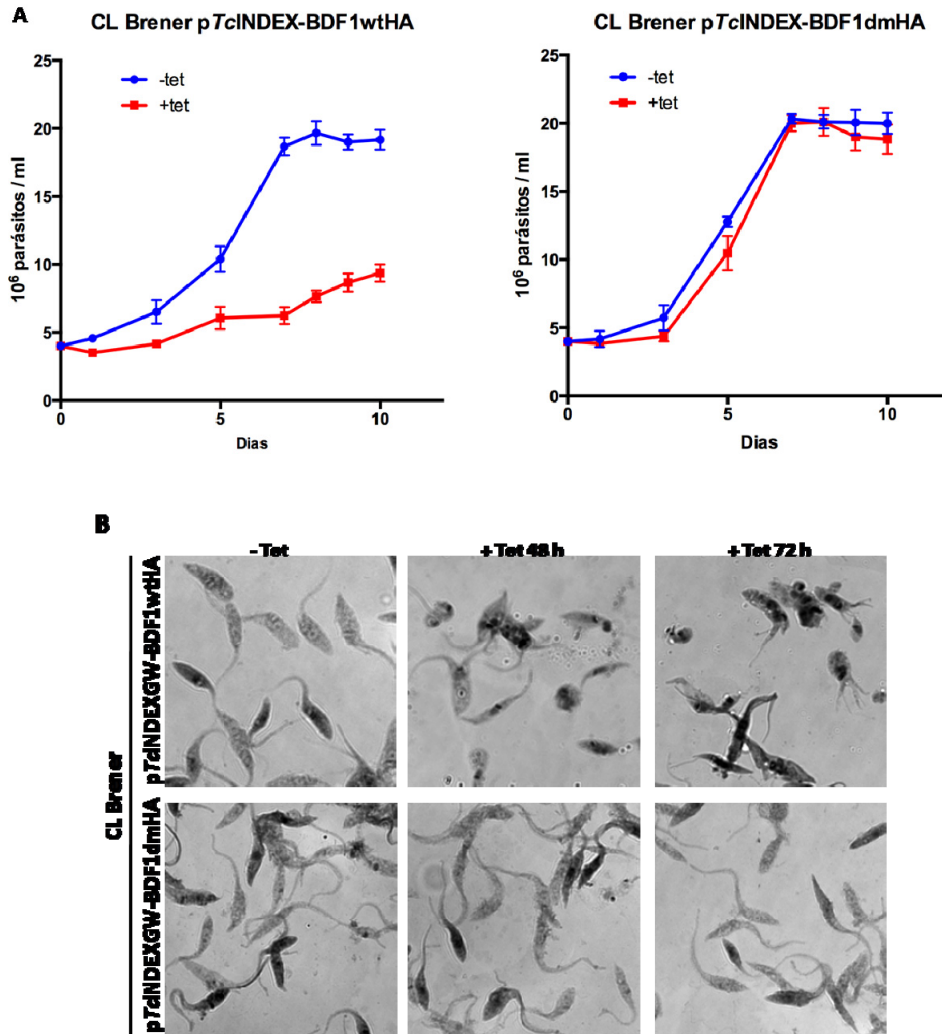


Figura 30: Efecto de la sobreexpresión en epimastigotes. A) Curvas de crecimiento de epimastigotes en medio LIT en ausencia (- tet, azul) o en presencia (+tet, rojo) de Tetraciclina 0.5 ug/ml. Los parásitos se contaron cada 24-48 horas en cámara de Neubauer durante 10 días. B) Epimastigotes en ausencia (- Tet) o en presencia (+ Tet) de Tetraciclina 0.5 ug/ml a distintos tiempos teñidos con Giemsa. Imágenes obtenidas con un microscopio Nikon NiU E300.

II.9. Análisis de la ultraestructura de los transfectantes.

Al observar los epimastigotes de la cepa CL Brener pTcINDEXGW-BDF1wtHA por microscopía electrónica de transmisión, los parásitos inducidos muestran alteraciones nucleares en comparación con la cepa sin inducir (Figura 31A) como condensación (Figura 31B) seguida de dispersión (Figura 31C) de la región granular del nucleolo, así como fragmentación nucleolar y desorganización nuclear (Figura 31E). También se observa una hipercompactación de la cromatina situada en la periferia nuclear (Figura 31F), compatible con un proceso apoptótico. Los parásitos inducidos también exhiben

glicosomas más grandes y menos electrodensos (Figura 31 G-I), lo que se puede relacionar a niveles de importación proteico mayores.

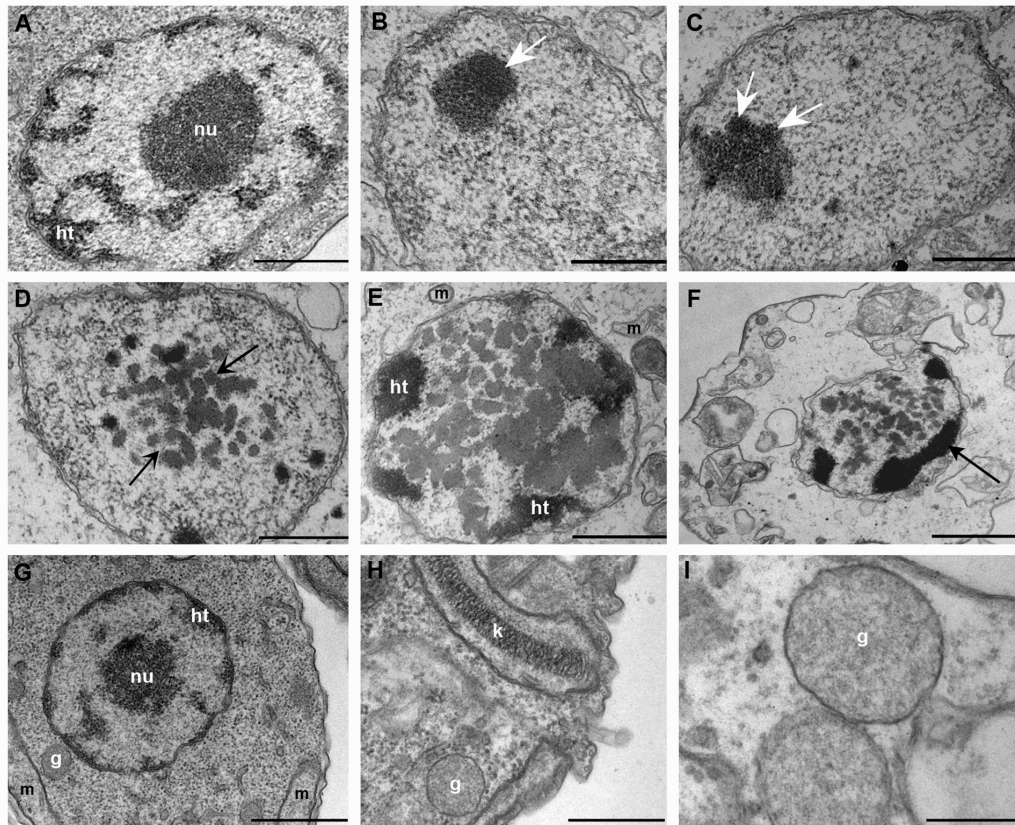


Figura 31: Microscopía electrónica de la cepa CL Brener pTcINDEXGW-BDF1wtHA en ausencia (A y G) o presencia de Tetraciclina. La región del nucleolo, que probablemente corresponde al dominio granular, se ve condensada (B, flecha) y fragmentada (C y D, flechas). La estructura nuclear está completamente desorganizada (E). Se ve compactación de la cromatina (F, flecha) cerca de la envoltura nuclear, lo que indica apoptosis. También se ve el citoplasma extraído (F). Los epimastigotes no inducidos (G) presentan glicosomas (g) con la típica ultraestructura. En cambio, los inducidos (H-I) presentan glicosomas más grandes y menos electrodensos. Nu = nucleolo; ht = heterocromatina; K= kinetoplasto. Barras: (A) 0,5 μ M; (B - E) 1 μ M; (F) 2 μ M. (G - H) = 1 μ M; (I) = 0,5 μ M.

II.10. Metacicllogénesis *in vitro*.

Se obtuvieron tripomastigotes metacíclicos a partir de epimastigotes *in vitro* usando el medio TAU como se describe en Materiales y Métodos. La sobreexpresión de TcBDF1dmHA no tuvo efecto en la diferenciación a tripomastigotes, mientras que la sobreexpresión de TcBDF1wtHA disminuyó la tasa de metacicllogénesis (Figura 32A) probablemente debido a su efecto deletéreo en epimastigotes. En la figura 32B se observa la tinción con Giemsa de los parásitos realizada para contar tripomastigotes y

epimastigotes, en la línea TcBDF1wtHA se ven muchos parásitos con morfología aberrante.

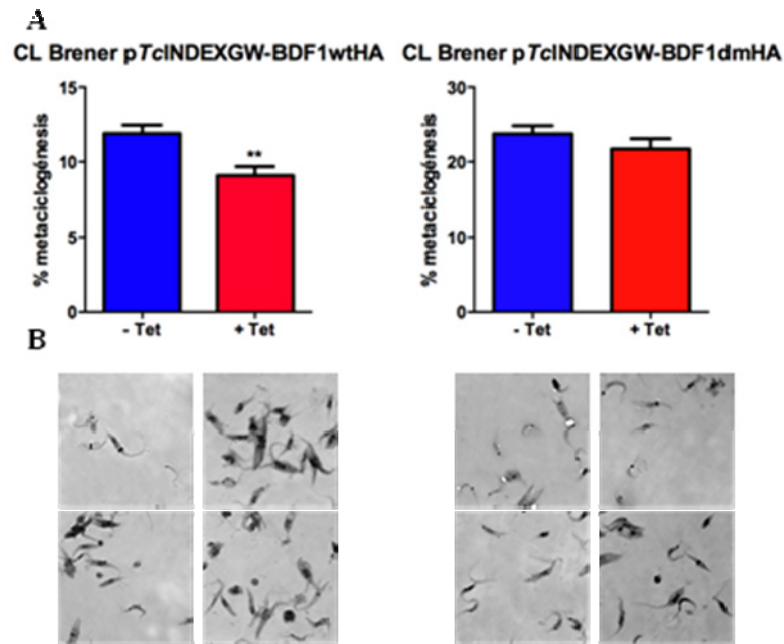


Figura 32: Metaciclógenesis *in vitro* de las cepas CL Brener pTcINDEXGW-BDF1wtHA y pTcINDEXGW-BDF1dmHA en ausencia (- Tet) o presencia (+ Tet) de Tetraciclina 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A) La barra de error representa la media \pm el desvío estándar de tres experimentos independientes; ** $P < 0.005$ (T de Student, no paramétrico). B) Tinción con Giemsa de las metaciclógenesis *in vitro*. Imágenes obtenidas con un microscopio Nikon NiU E300.

II.11. Ensayos de infección de células de mamífero.

Para estudiar la importancia de la expresión de TcBDF1 en la infectividad de tripomastigotes y en la forma replicativa del huésped mamífero, analizamos la capacidad invasiva y replicativa de las cepas transfectantes inducida con Tetraciclina.

Los tripomastigotes obtenidos de infecciones de células fueron pre incubados en medio DMEM en ausencia o presencia de 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tetraciclina y luego utilizados para infectar células Vero en una relación 25:1 (25 parásitos por célula). Después de 16 horas de infección a 37°C, se lavaron los tripomastigotes libres y se agregó DMEM con o sin Tetraciclina por dos días.

Para analizar el efecto del Factor con Bromodominio 1 en la infectividad de tripomastigotes, nos centramos en la condición (+/-), en la cual la expresión se indujo solo en los tripomastigotes durante la infección. Como se puede ver en la figura 33A, la sobreexpresión de TcBDF1wtHA incrementa la tasa de infectividad [(+/-) vs (-/-)],

mientras que la de versión mutante la disminuye [(+/-) vs (-/-)]. Por otro lado, para evaluar el efecto de la sobreexpresión en la proliferación de amastigotes intracelulares (Figura 33B), nos centramos en la condición en la cual sólo agregamos Tetraciclina post-infección, por 48 horas luego de lavar los tripomastigotes (-/+). En esta condición también TcBDF1 salvaje favorece la duplicación de amastigotes, mientras que la mutante la disminuye. Estos resultados muestran que TcBDF1 es esencial para la invasión del hospedador y la progresión de la infección y sugieren que sería un interesante blanco para el desarrollo de inhibidores de bromodominios.

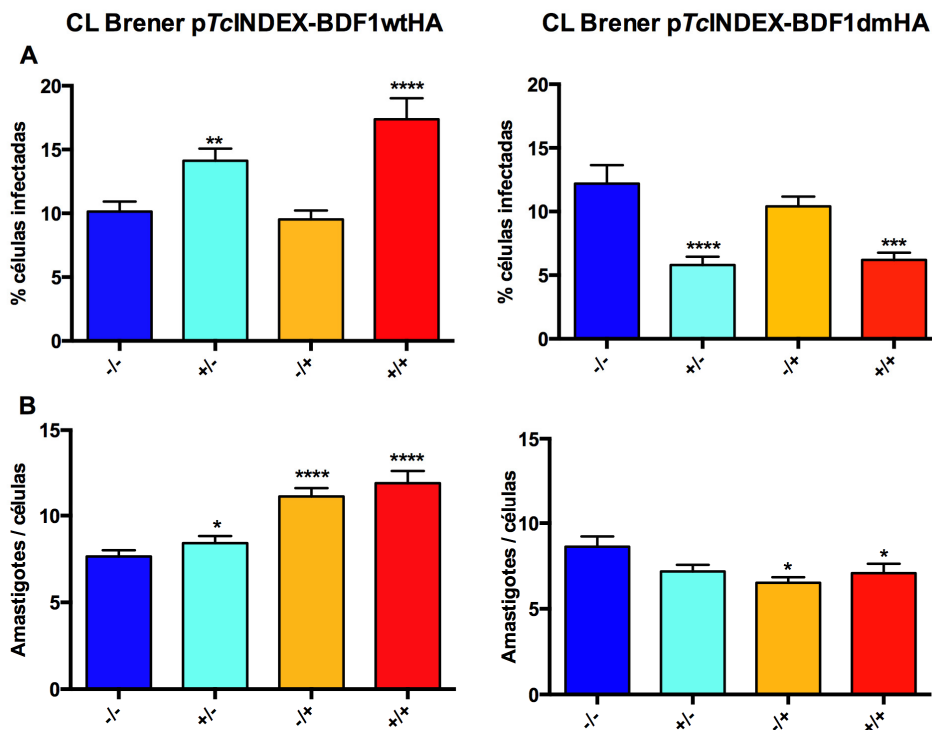


Figura 33: La sobreexpresión de TcBDF1 impacta en la infección de células Vero. Las incubaciones durante la infección y post-infección se realizaron en ausencia o presencia de 0.25 µg/ml Tetraciclina: (-/-), nunca se agregó Tet al medio; (+/-), los tripomastigotes fueron pre-tratados con Tet por 3 horas previo a la infección, y se agregó Tet durante la infección pero no después; (-/+), los tripomastigotes no se indujeron, la Tet sólo se adicionó por 48 horas post-infección; (+/+), los tripomastigotes fueron pre-tratados y la Tet estuvo presente durante todo el experimento. El porcentaje de células infectadas (A) y el número de amastigotes por célula (B) se determinó contando las células adheridas en cubreobjetos teñidos con Giemsa usando un microscopio óptico. Los resultados se expresan como media ± el desvío estándar de triplicados y representan uno de tres experimentos realizados. Cada condición se analizó por T de Student, no paramétrico en relación al control (-/-): * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

DISCUSION

El Factor con Bromodominio 1 es una proteína cuya expresión está regulada a través del ciclo de vida de *T. cruzi*. Una de las características más llamativas de TcBDF1, es su localización glicosomal. A pesar de que no podemos asegurar que esta organela es el único compartimento en el que se encuentra, los resultados presentados apoyan la idea de que en epimastigotes, la proteína es mayoritariamente dirigida al glicosoma por el péptido señal PTS2.

La existencia de bromodominios no-nucleares no es una novedad en *T. cruzi*. Como ya mencionamos, TcBDF3, caracterizado en el laboratorio, es una proteína citoplasmática y flagelar [175]. Algunas proteínas con bromodominios de mamíferos también se encuentran en el citoplasma, pero todos los casos reportados hasta el momento son de proteínas nucleares que en ciertas situaciones, como la foliculogénesis del ovario o el desarrollo de la médula espinal, se exportan al citoplasma [182-184]. Sin embargo, hasta la fecha, no ha habido ningún factor con bromodominio reportado que se localice en una organela distinta del núcleo.

La presencia de un bromodominio en el glicosoma plantea muchas preguntas sobre la existencia de la acetilación y su función en esta organela. Una característica importante de las enzimas glicolíticas glicosomales, es que carecen de la típica regulación alostérica presente en el resto de los organismos. Sin embargo, enzimas antagónicas (como la Fosfofructo kinasa y la Fructosa-1,6-bisfosfatasa) coexisten en la organela, por lo que sus actividades deben estar reguladas. Se ha propuesto que una modificación post-traducciona podría ser responsable de este fenómeno. Se estudió el estado de fosforilación diferencial entre las formas procíclica y sanguínea de *T. brucei*, pero los resultados obtenidos no pueden explicar completamente la regulación enzimática dentro del glicosoma [185]. Teniendo en cuenta nuestros resultados del capítulo I, sabemos que el 30% de las enzimas del metabolismo energético de *T. cruzi* están acetiladas, entre las cuales cinco son enzimas glicosomales pertenecientes al metabolismo de la glucosa.

Actualmente es difícil definir el rol del bromodominio más allá de la unión de proteínas acetiladas. A pesar de que se ha investigado mucho a los bromodominios de levaduras y mamíferos, su función real aún no se conoce. En el núcleo, la asociación del bromodominio con acetiltransferasas llevó a proponer un rol en la hiperacetilación de algunas regiones de la cromatina. En este modelo, los complejos o proteínas con bromodominios reconocen histonas acetiladas y promueven una acetilación pronunciada. TcBDF1 no posee otro dominio funcional además del bromodominio, pero

probablemente interactúe con otras proteínas a través de su dominio C-terminal de baja complejidad. En este contexto, TcBDF1 sería parte de un mecanismo regulatorio global de la actividad glicosomal. Una posibilidad es que al igual que en el núcleo promueva la hiperacetilación de proteínas o complejos, o la deacetilación, al ser parte de complejos con acetiltransferasas o deacetilasas. También puede estar implicada en el importe de proteínas acetiladas al glicosoma, en promover la interacción de proteínas, en proteger de la deacetilación o en la biogénesis/autofagia de la organela.

Finalmente, los resultados obtenidos en los ensayos de infección *in vitro* nos permiten proponer que TcBDF1 sería un posible blanco para el desarrollo de drogas tripanocidas.

CAPITULO III: “SIRTUINAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*”.

III.1. Identificación de homólogos de Sir2 en *T. cruzi*.

Dos secuencias codificantes (*Tc*CLB.507519.60 y *Tc*CLB.506559.80) correspondientes a proteínas relacionadas a ScSir2 fueron identificadas en el genoma de *T. cruzi*, llamadas *TcSIR2RP1* y *TcSIR2RP3* respectivamente (<http://www.tritrypdb.org/tritrypdb/>). *TcSir2rp1* y *TcSir2rp3* codifican proteínas de 359 y 241 aminoácidos, con pesos moleculares predichos de ~ 39.6 y 26.8 kDa y pls de 6.39 y 6.51, respectivamente. El alineamiento de las sirtuinas de *T. cruzi* con SIRTs humanas y ScSir2 (Figura 34) muestra que a pesar de que las *TcSIR2RPs* carecen de la porción N-terminal, la cual es requerida para la localización nucleolar de ScSir2, contienen un dominio catalítico completo (Pfam: PF02146). *TcSIR2RP1* contiene un motivo rico en Serinas hacia el C-terminal y uno de los residuos de Cys del motivo de unión a zinc (tipo CX₂CX₂₀CX₂C) está ausente en *TcSIR2RP3*. Los motivos GAD y NID así como otros residuos importantes para la catálisis están conservados (HG, flechas en la figura 34). El dominio catalítico de *TcSIR2RP1* y *TcSIR2RP3* comparten una identidad/similitud de secuencia de 17.5%/26.3% entre ellas y 23.1%/33.9% y 20.8%/33.7% con ScSir2 respectivamente. En un análisis filogenético, *TcSIR2RP1* agrupó con la *HsSIRT2* citoplasmática, mientras *TcSIR2RP3* está más relacionada a sirtuinas bacterianas y *HsSIRT5* mitocondrial (Figura 35). Cabe mencionar que a pesar de las discrepancias observadas para cada sirtuina de diferentes especies de TriTryps en cuanto a su localización y función, estas enzimas están conservadas a nivel de secuencia y se ubican juntas en el análisis filogenético.

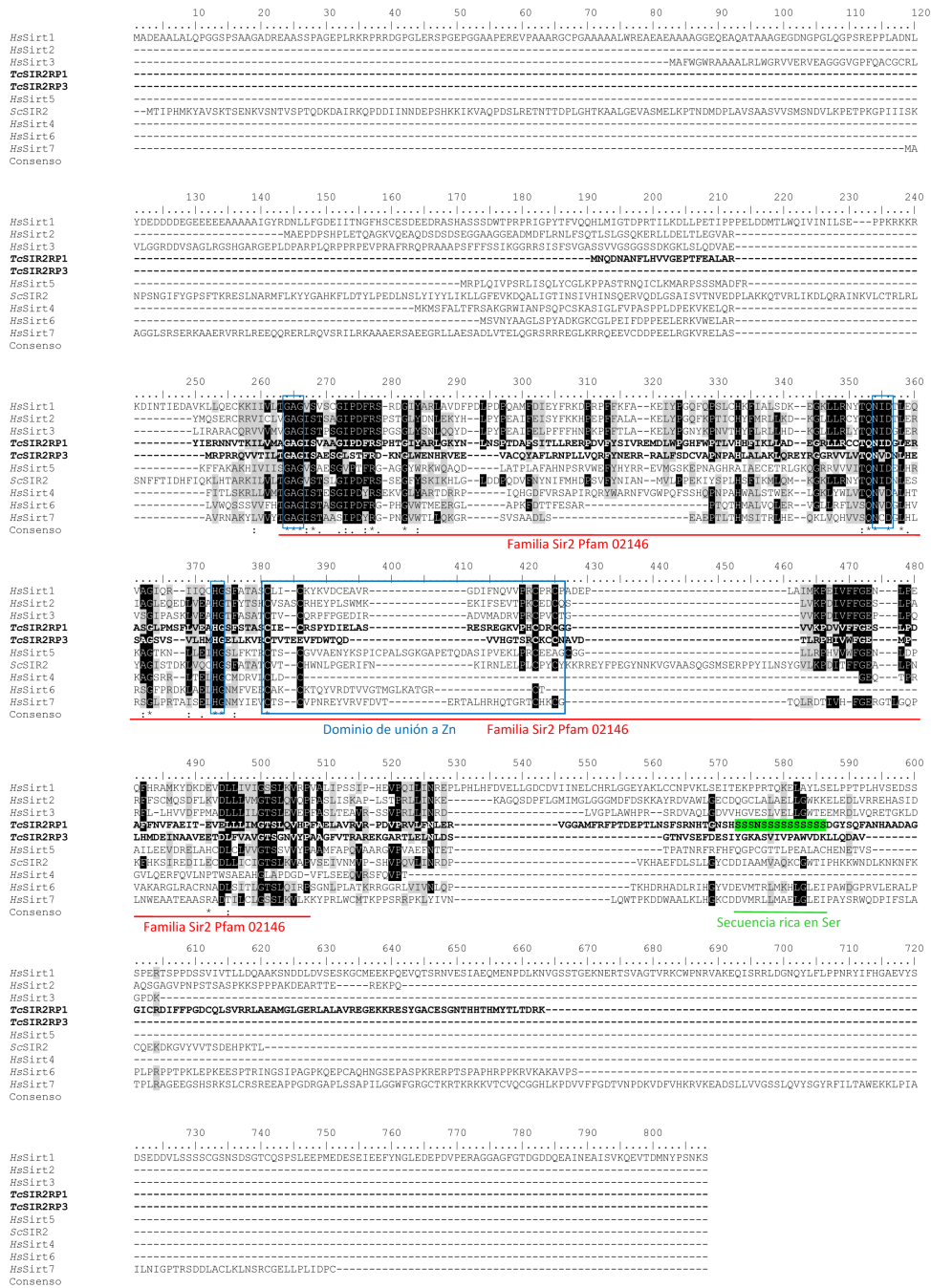


Figura 34: Alineamiento de secuencia de las sirtuinas. TcSIR2RP1 y TcSIR2RP3 se alinearon con las siete sirtuinas humanas (HsSIRT1-7) y con el miembro fundador de la familia Sir2 (ScSir2) usando ClustalX2.1 y edición manual para resaltar los aminoácidos conservados e idénticos basándonos en BLOSUM 62. Se puede observar la ausencia de la secuencia N-terminal en ambas secuencias de *T. cruzi* y el dominio C-terminal rico en serinas característico en TcSIR2RP1. La conservación del dominio catalítico, en particular los residuos de Cys del dominio de unión a Zinc, y los residuos GAG, NID y HG están indicados. Las flechas indican los residuos conservados críticos del dominio catalítico y de unión a NAD⁺ de acuerdo a estructuras cristalográficas de otros miembros de la familia [186].

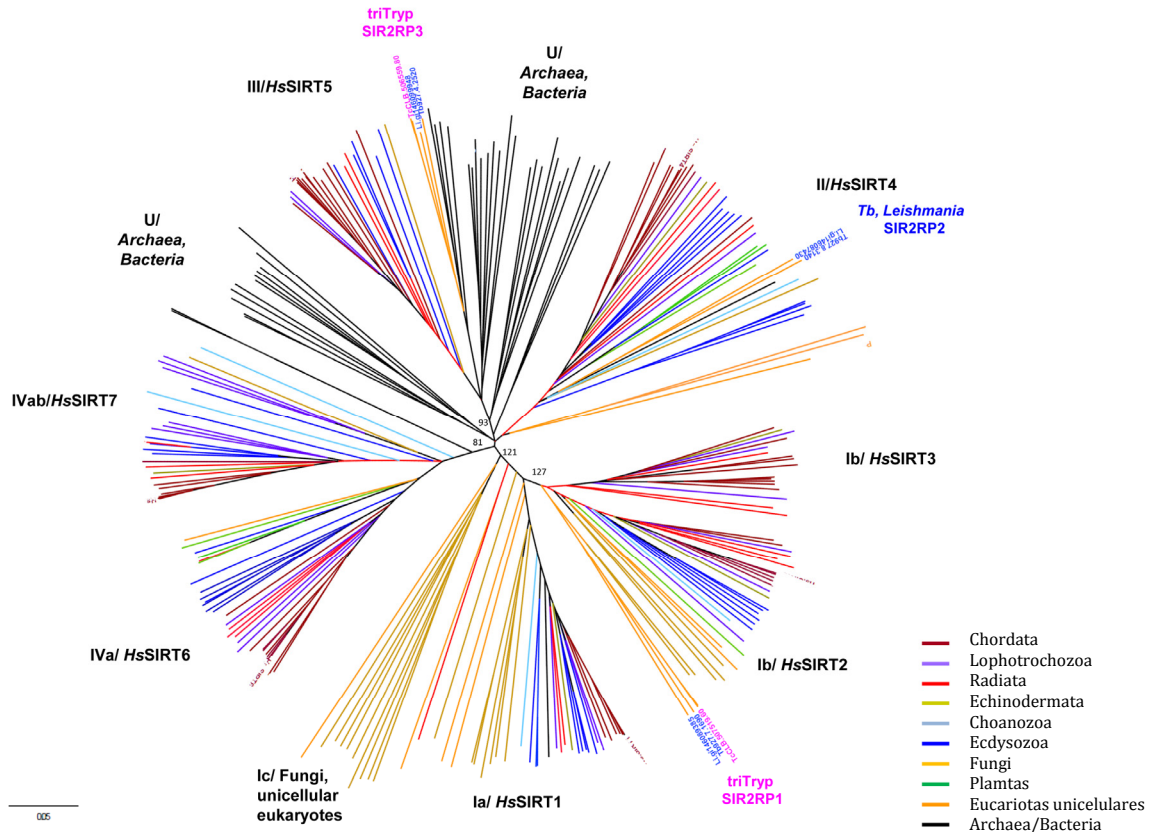


Figura 35: Análisis filogenético. Árbol filogenético desarraigado de las secuencias de sirtuinas de TriTryps y diferentes taxa (revisado en [187]). El árbol se contruyó usando Clustal X2.1 con el método de “Neighbor-Joining”, con un número generador semilla al azar de 150 y 5000 Bootstrap. Los colores de las ramas son usados para mostrar que taxa tiene sirtuinas miembros de cada uno de los grupos de sirtuinas previamente descriptos. Solo se indican los nombres de las sirtuinas de los TriTryps.

III.2. Obtención de las proteínas recombinantes.

Se amplificaron las secuencias codificantes de ambas sirtuinas a partir de ADN genómico de *T. cruzi*. Los productos de PCR se clonaron por corte con enzimas de restricción y ligación en el vector de entrada pENTR3C y luego de secuenciarlos se pasaron por recombinación al vector de destino pDEST17 para la obtención de las proteínas fusionadas a un epítipo de poli-histidina (6xHis). Estos plásmidos fueron transformados en la cepa *E. coli* BL21 pLys S para la obtención de las proteínas recombinantes luego de la inducción con IPTG. En la figura 36 se muestra el análisis electroforético (SDS-PAGE, teñido con Azul de Coomassie), donde se resuelven los extractos proteicos obtenidos a partir de bacterias que contienen los plásmidos pDEST17-TcSIR2RP1 y TcSIR2RP3, en presencia y ausencia de IPTG 0,5 mM, a seis horas de incubación. Dado que no se distingue claramente la sobreexpresión, los extractos proteicos se sometieron a western blot con el anticuerpo comercial anti-Histidina de ratón, observándose en ambos casos

la inducción de un polipéptido del tamaño predicho para las proteínas recombinantes en las fracciones insolubles.

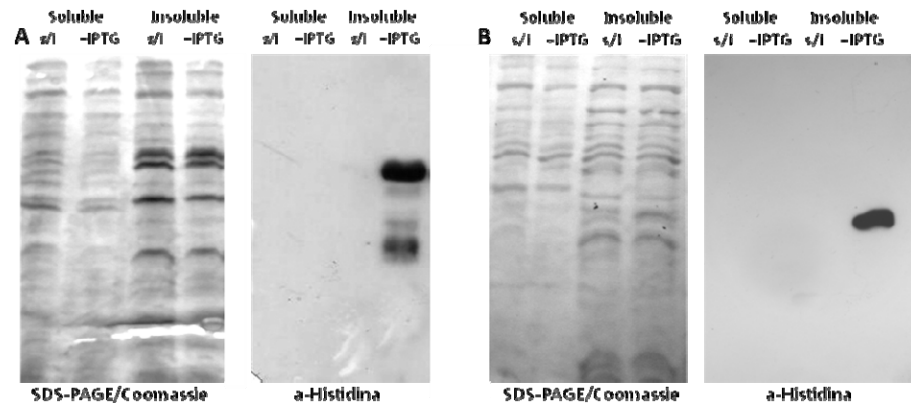


Figura 36: SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie y western blot con anti-Histidina de los extractos proteicos de BL21 pLys S. s/i: sin inducción. A) pDEST17-TcSIR2RP1 y B) pDEST17-TcSIR2RP3.

Ambas proteínas se obtienen en las fracciones insolubles, por lo tanto fueron purificadas en condiciones desnaturalizantes, utilizando una matriz de afinidad Ni²⁺-agarosa (Qiagen). En la figura 37 se observa el SDS-PAGE (teñido con Azul de Coomassie) con las fracciones eluídas durante la purificación y las proteínas puras recuadradas en rojo.

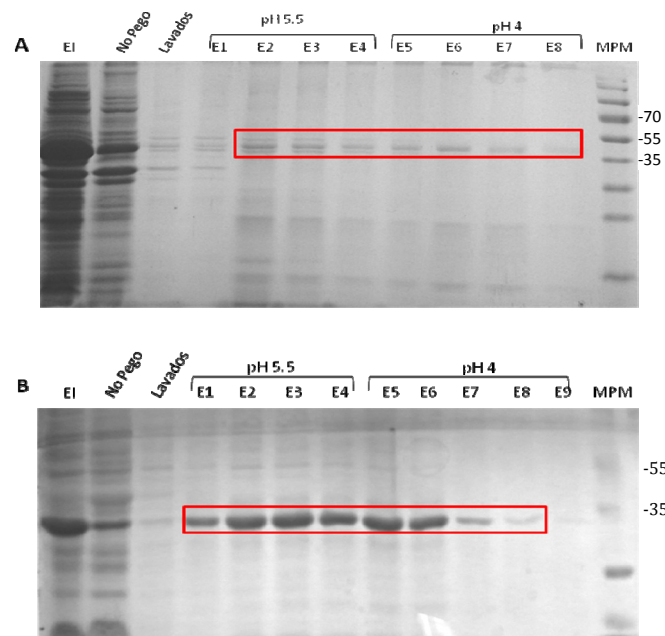


Figura 37: SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie de las purificaciones en condiciones desnaturalizantes con matriz Ni-NTA de A) TcSIR2RP1 His y B) TcSIR2RP3 His. EI, extracto insoluble. E, eluído. MPM, marcador de peso molecular.

Las proteínas puras se sometieron a electro elusión antes de la inoculación de conejos para la producción de anticuerpos. Una vez obtenidos los sueros, se chequeó su especificidad con extractos totales de epimastigotes (Figura 38). Ambos sueros detectan solo una banda del peso molecular esperado.



Figura 38: Chequeo de la especificidad de los antisueros. Western blot de extractos proteicos totales (ET) de epimastigotes de la cepa Dm28c con los anticuerpos específicos policlonales obtenidos.

III.3. Expresión de las sirtuinas en el ciclo de vida de *T. cruzi*.

Para verificar la expresión de las sirtuinas en los distintos estadios, preparamos extractos proteicos totales de epimastigotes, amastigotes intracelulares y tripomastigotes provenientes de células infectadas y se sometieron a western blot con los anticuerpos específicos y con α -tubulina para normalizar a la cantidad de proteína de cada extracto. Como se puede observar en la figura 39, TcSIR2RP1 es más abundante en los estadios replicativos que en el infectivo, mientras que TcSIR2RP3 es más abundante en epimastigotes que en amastigotes y no se observa en tripomastigotes.

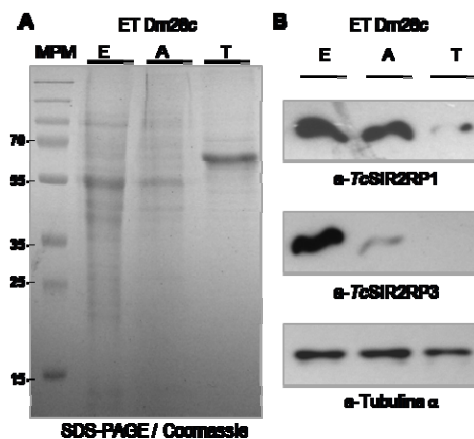


Figura 39: La expresión de las sirtuinas está regulada en el ciclo de vida de *T. cruzi*. Cantidades iguales de extractos proteicos totales (ET) de epimastigotes (E), amastigotes (A) y tripomastigotes (T) se sembraron

en un gel de poliacrilamida seguido de (A) tinción con Coomassie o (B) transferencia a membrana de nitrocelulosa y western blot con los anticuerpos específicos y anti-Tubulina α como control de carga. MPM, marcador de peso molecular.

III.4. Obtención de cepas sobreexpresantes.

Las secuencias codificantes de ambas sirtuinas con un epítotope de HA se clonaron por recombinación al vector p7cINDEXGW. Con las construcciones obtenidas se transfectaron epimastigotes Dm28c. Una vez seleccionados los parásitos transfectantes, se chequeó la inducción con tetraciclina por western blot de extractos proteicos totales (Figura 40A-B) e inmunofluorescencia (Figura 40C). Como se puede observar, sólo se detectan las proteínas exógenas en presencia de Tetraciclina. Además, al detectar las proteínas tanto endógenas como exógenas con anticuerpos específicos, pudimos cuantificar los niveles de sobreexpresión obtenidos, los cuales fueron aproximadamente 20 veces mayores (Figura 40B).

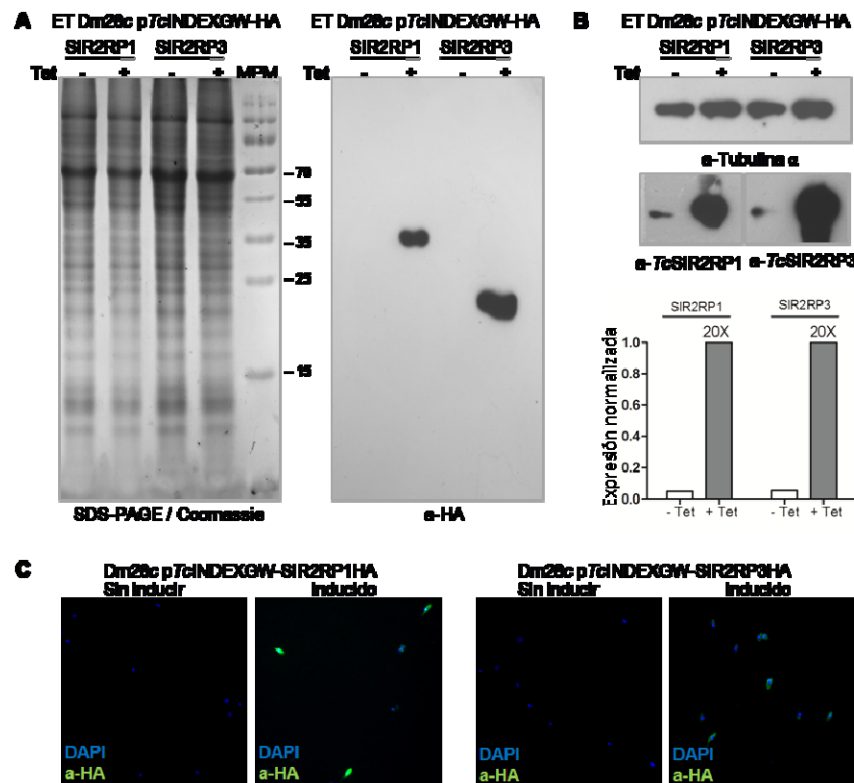


Figura 40: Chequeo de la sobreexpresión con Tetraciclina a 0.25 μ g/ml. A) Western blot de los extractos proteicos totales con anti-HA y con B) anti-Tubulina y los anticuerpos específicos para calcular los niveles de sobreexpresión respecto de la proteína endógena. MPM, marcador de peso molecular. C) Inmunofluorescencia de epimastigotes tranfectados, sin inducir e inducidos con Tetraciclina, con anti-HA. Anticuerpo secundario: anti-rata conjugado a FITC. El ADN del núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Imágenes obtenidas con un microscopio Nikon NiU E300.

También testeamos la sobreexpresión inducible de las sirtuinas a través del ciclo de vida de *T. cruzi* por western blot de extractos proteicos (Figura 41A) e inmunofluorescencia (Figura 41B) de los tres estadíos utilizando el anticuerpo anti-HA. Como se puede observar en la figura 41, las proteínas exógenas están presentes en todos los estadíos sólo en presencia de Tetraciclina.

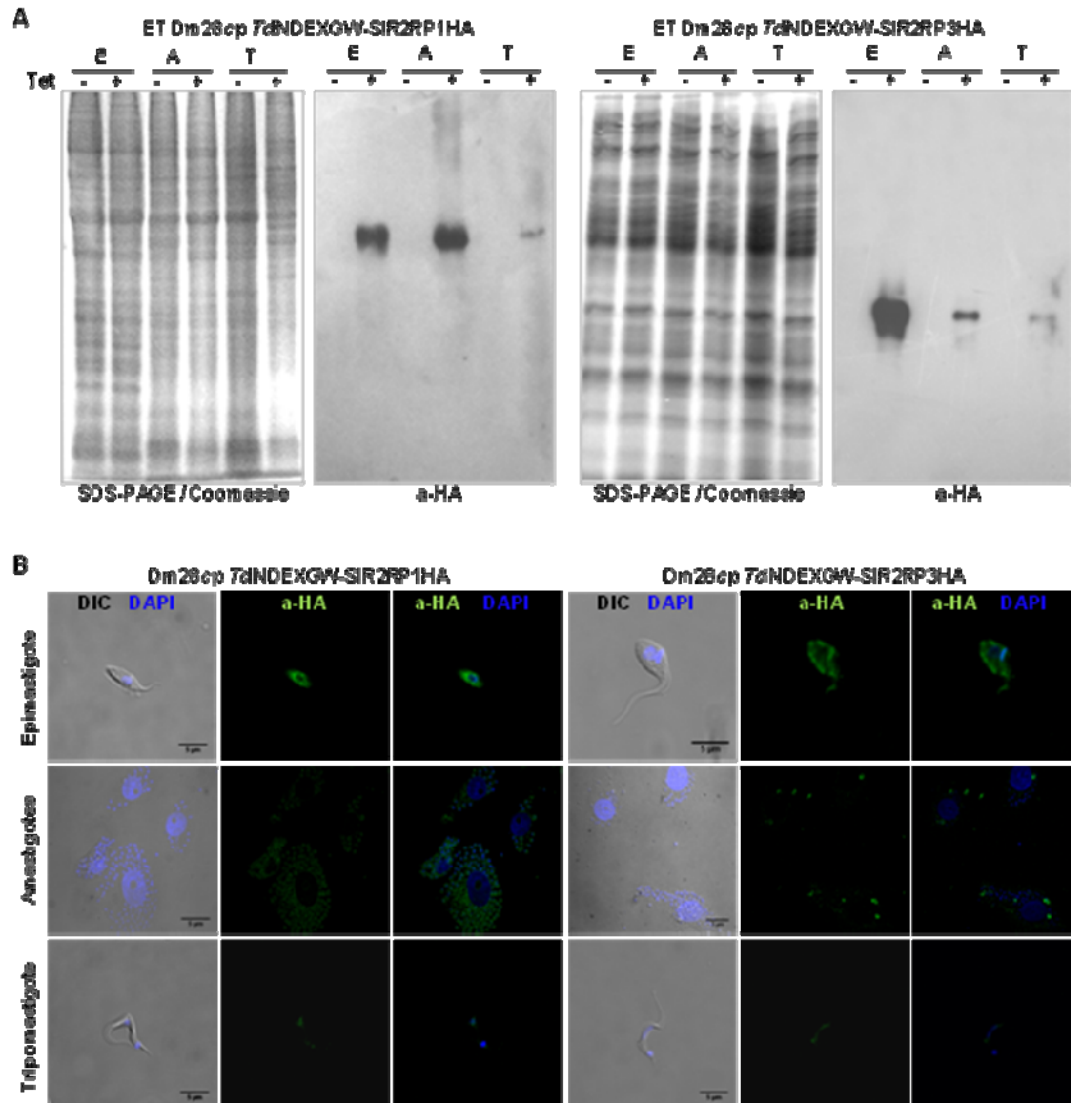


Figura 41: Sobreexpresión de TcSIR2RP1HA y TcSIR2RP3-HA. A) Western blot de extractos proteicos totales (ET) de epimastigotes (E), amastigotes (A) y tripomastigotes (T), en ausencia y en presencia de Tetraciclina. B) Inmunofluorescencia de epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes, en presencia de Tetraciclina. Anticuerpo secundario: anti-rata conjugado a FITC. El ADN del núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Imágenes obtenidas con un microscopio confocal Nikon TE-2000-E2. DIC, contraste de interferencia diferencial. Merge, superposición de canales. Barra: 5 μ m

III.5. TcSIR2RP1 se localiza en el citosol y TcSIR2RP3 en la mitocondria.

Para determinar la localización subcelular de las sirtuinas realizamos inmunocolocalización de epimastigotes Dm28c salvaje con los anticuerpos específicos (Figura 42A) y de las cepas sobreexpresantes inducidas durante tiempos cortos con anti-HA (Figura 42B) y con marcadores citoplasmático (Tirosina amino transferasa) y mitocondriales (MitoTracker y Malato deshidrogenasa mitocondrial). También realizamos un fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial de las cepas inducidas (Figura 42C). Mediante las tres aproximaciones, confirmamos que TcSIR2RP1 se localiza en el citoplasma y TcSIR2RP3 en la mitocondria.

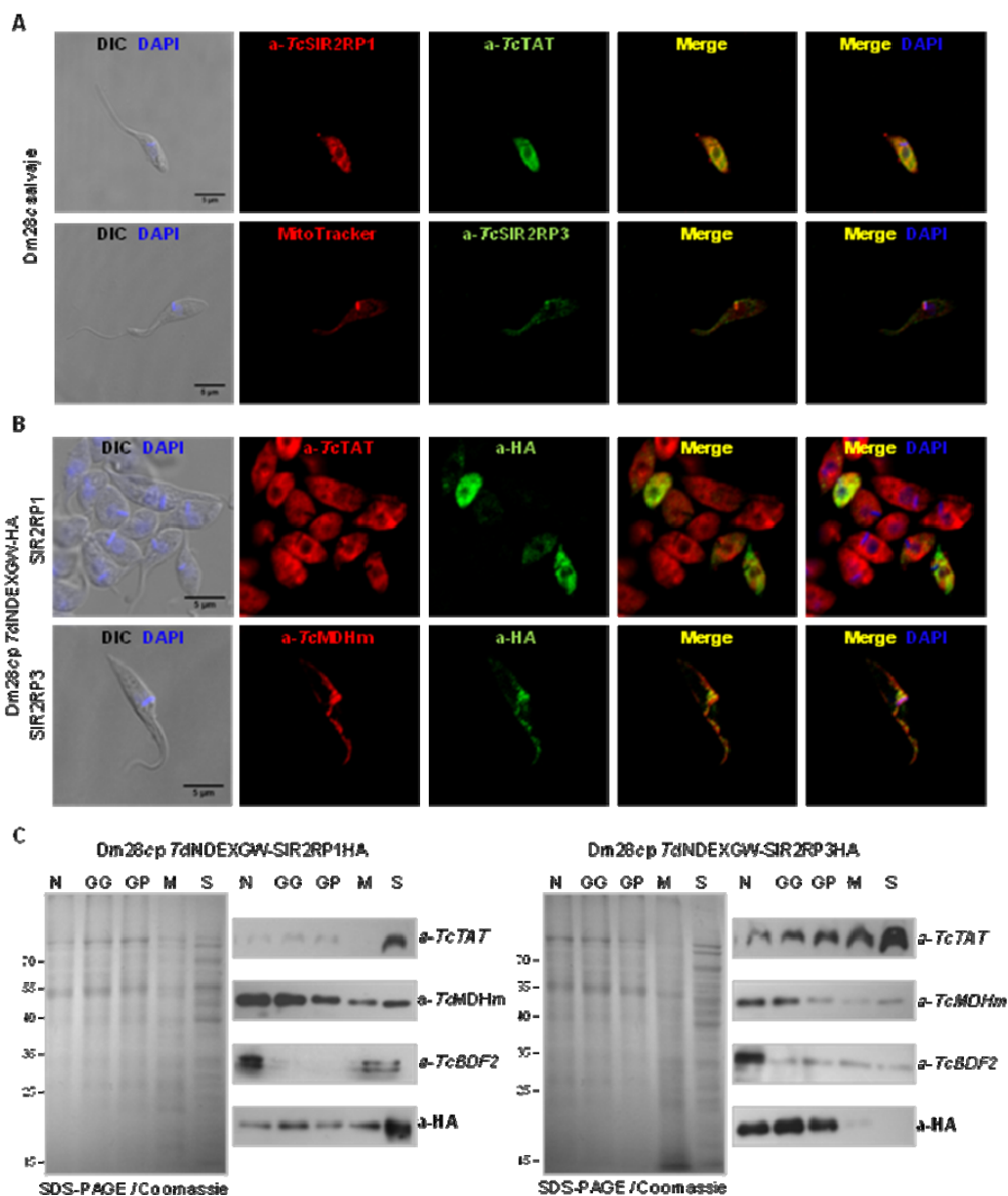


Figura 42: Análisis de la localización subcelular. A) Inmunofluorescencia de epimastigotes Dm28c salvaje con los anticuerpos específicos y los marcadores correspondientes. B) Inmunofluorescencia de las cepas sobreexpresantes inducidas con anti-HA y los marcadores. Anticuerpos secundarios: anti-conejo conjugado a Cy3 y a FITC, anti-raton conjugado a FITC y anti-rata conjugado a FITC. El ADN del núcleo y kinetoplasto se marcó con DAPI. Imágenes obtenidas con un microscopio confocal Nikon TE-2000-E2. DIC, contraste de interferencia diferencial. Merge, superposición de canales. Barra: 5 μ m. C) Fraccionamiento subcelular de las cepas sobreexpresantes inducidas. N: núcleos, GG: granulos grandes, GP: granulos pequeños, M: microsomas y S: sobrenadante final. Anti-TcBDF2: marcador nuclear, el cual se ve enriquecido en la fracción N. Como era de esperar, el marcador citosólico (TcTAT) en ambos casos se ve enriquecido en la fracción S y el mitocondrial (TcMDHm) principalmente en GG, N y GP. Debido a que este es un enriquecimiento y no una purificación, también se observa señal en menor medida en las otras fracciones.

III.6. Actividad deacetilasa de las sirtuinas de *T. cruzi*.

Con el objetivo de evaluar la actividad deacetilasa de las sirtuinas sobreexpresadas, realizamos western blots de extractos proteicos totales de epimastigotes de cada cepa en ausencia y presencia de Tetraciclina con anticuerpos anti-Acetil Lisina. La figura 43A muestra la carga proteica para cada condición. La sobreexpresión de ambas sirtuinas reduce los niveles de acetilación de proteínas específicas (Figura 43B). Las proteínas diferencialmente acetiladas están marcadas con flechas. Vale la pena destacar, que las proteínas deacetiladas son diferentes para cada sirtuina sobreexpresada.

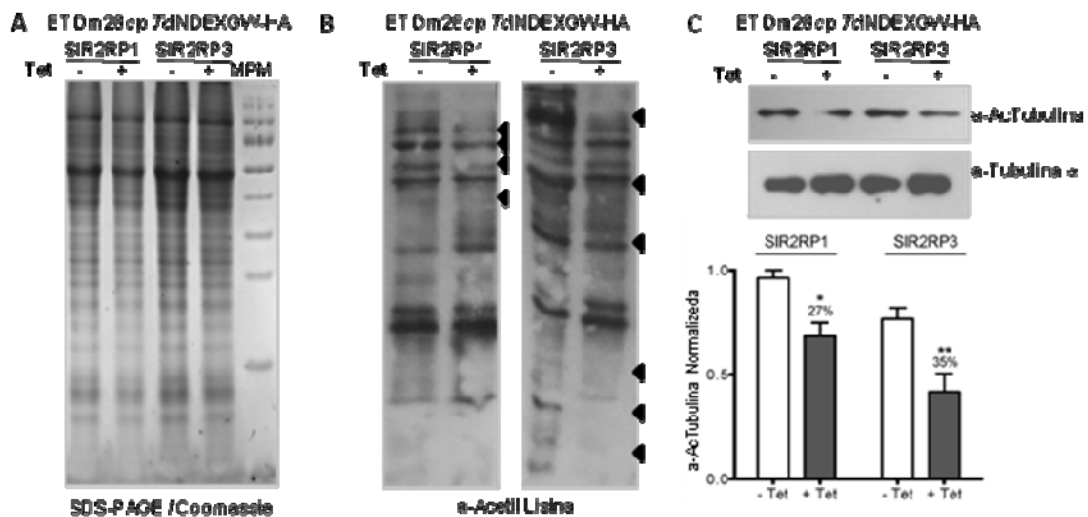


Figura 43: La sobreexpresión de sirtuinas cambia los niveles de acetilación en epimastigotes. Cantidades iguales de extractos proteicos totales (ET) de cada cepa en ausencia (barras blancas) o presencia (barras grises) de 0.25 μ g/ml Tetraciclina por 24 horas, fueron sembrados en geles de poliacrilamida. A) Coomassie. MPM, marcador de peso molecular. B) Western blot con anti-Acetil Lisina y C) con anti-Tubulina acetilada y anti-Tubulina como control de carga para normalizar en la cuantificación. La intensidad de las bandas de tubulina acetilada se cuantificaron en n=3 experimentos independientes. El

grafico de barra representa la media \pm desvío estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ (t de student no paramétrico).

La α -tubulina es una de las proteínas acetiladas más abundantes en trypanosomas. Más aun, la tasa de α -tubulina acetilada/no acetilada en trypanosomas es más alta que en otras células eucariotas como levaduras o células de mamíferos [188]. Para ver si alguna de las TcSIR2RPs puede deacetilar α -tubulina, medimos α -tubulina acetilada en los parásitos inducidos y sin inducir por western blot. Al normalizar con α -tubulina total, los resultados muestran una disminución significativa de la forma acetilada en las líneas sobreexpresantes (Figura 43C). La deacetilación de α -tubulina mediada por SIR2RP1 fue reportada previamente en *Leishmania*. Sin embargo, consideramos que no podemos asignarle específicamente a ninguna de las dos sirtuinas el rol de la deacetilasa de la α -tubulina. La disminución en la acetilación podría ser un resultado no específico, producto del aumento general de la actividad deacetilasa en el interior de la célula. Además, en células de mamíferos se demostró que la tubulina es deacetilada no solo por SIRT2, sino también por HDAC6 [100]. Dado que hay más de una deacetilasa con similitud a HDAC6 en tripanosomátidos, un estudio más profundo de todo el conjunto de deacetilasas es necesario para determinar la principal deacetilasa de tubulina en este organismo.

III.7. Análisis de la morfología de los parásitos sobreexpresantes de TcSIR2RP1 y TcSIR2RP3.

Para evaluar si la sobreexpresión de las sirtuinas producía algún efecto fenotípico en los parásitos, se fijaron parásitos inducidos con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de Tetraciclina a distintos tiempos y se analizaron por: tinción con Giemsa y posterior visualización al microscopio Nikon NiU E300 y microscopía electrónica de transmisión (MET) (Figura 44) para la observación de las ultraestructuras celulares. No se observan diferencias entre las cepas inducidas y sin inducir.

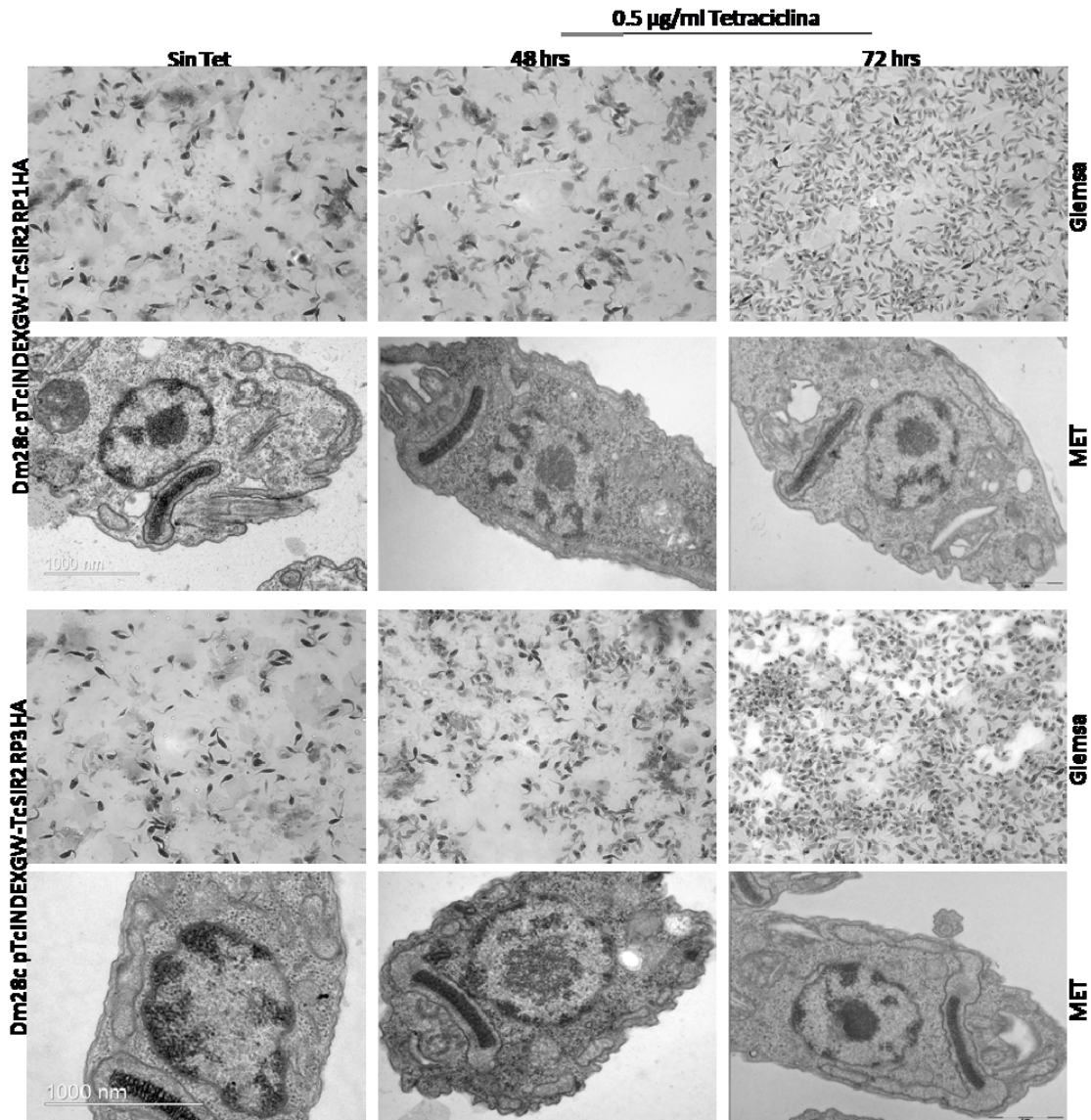


Figura 44: Análisis de la morfología de las cepas transgénicas en ausencia (sin tet) o presencia de 0.5 µg/ml de Tetraciclina a las 48 y 72 horas. Los parásitos fijados se tiñeron con Giemsa y se observaron al microscopio Nikon NiU E300 con aumento 60x. Alternativamente, parásitos fijados con glutaraldehído se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET), en la Universidad de Rio de Janeiro.

III.8. Efecto de la sobreexpresión de las sirtuinas en el crecimiento de epimastigotes.

Realizamos curvas de crecimiento de epimastigotes en ausencia y en presencia de Tetraciclina (0.5 µg/ml). Los parásitos se contaron cada 24 horas en cámara de Neubauer durante 15 días. La figura 45 muestra que la línea *TcSIR2RP1HA* crece a una tasa similar en ausencia y presencia de Tetraciclina, pero la línea *TcSIR2RP3HA* crece un poco más lento y en la fase estacionaria alcanza un menor número de parásitos por ml.

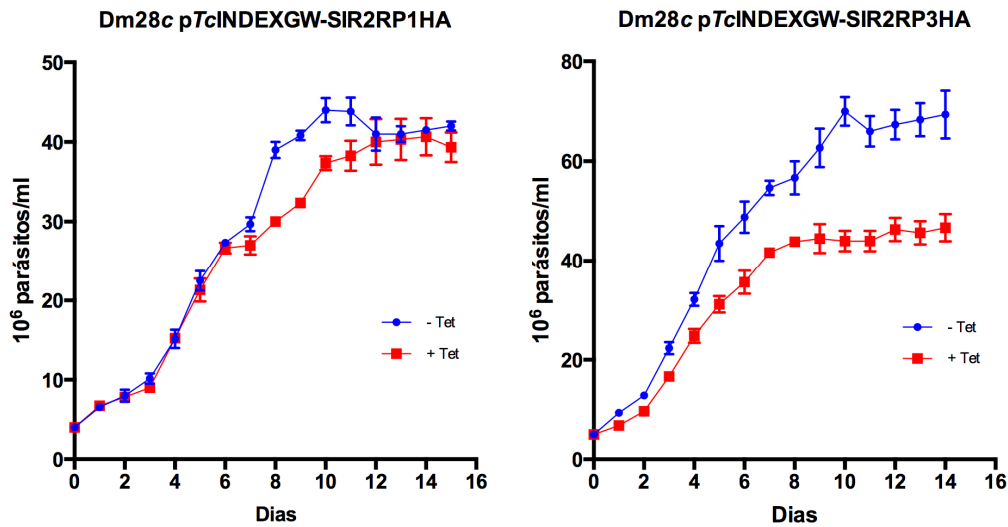


Figura 45: Curvas de crecimiento de epimastigotes en medio LIT en ausencia (- tet, azul) o en presencia (+tet, rojo) de Tetraciclina 0.5 ug/ml. Los parásitos se contaron cada 24-48 horas en cámara de Neubauer durante 15 días.

III.9. La sobreexpresión de TcSIR2RP1 estimula la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos.

Se obtuvieron tripomastigotes metacíclicos a partir de epimastigotes de ambas cepas, usando medio TAU, en ausencia (- Tet) o presencia (+ Tet) de Tetraciclina. La sobreexpresión de TcSIR2RP1 resultó en un incremento significativo de la metaciclogénesis (59%), mientras que la cepa TcSIR2RP3 mostró niveles similares en las dos condiciones (Figura 46).

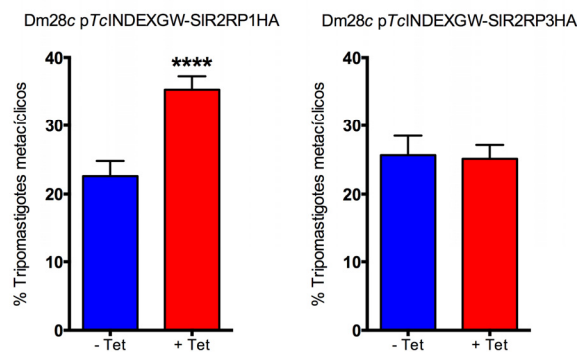


Figura 46: Metaciclogénesis *in vitro* usando medio TAU de las cepas TcSIR2RP1HA y TcSIR2RP3HA en dos condiciones: sin inducir (- Tet) o inducidos (+ Tet) con 0.5 µg/ml Tetraciclina. La barra de error representa la media \pm el desvío estándar de triplicados; **** $p < 0.0001$ (T de Student, no paramétrico).

III.10. La sobreexpresión de las sirtuinas afecta la infección *in vitro* de células de mamíferos.

Con el objetivo de analizar la importancia de la expresión de sirtuinas en la infección de tripomastigotes y en la replicación del estadio intracelular presente en el hospedador mamífero, evaluamos la capacidad de invasión y replicación de las líneas transgénicas al inducirlas con Tetraciclina. Primero, realizamos el experimento de infección *in vitro* usando parásitos Dm28c salvaje para asegurarnos que el tratamiento con Tetraciclina no produce ningún efecto (Figura 47). No hubo diferencias significativas ni en la tasa de infectividad ni en el número de amastigotes por célula.

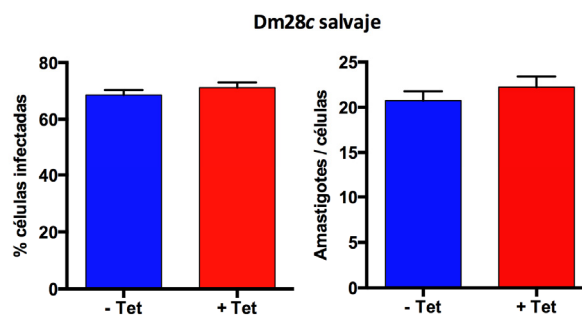


Figura 47: Efecto del tratamiento con Tetraciclina en la infección de parásitos Dm28c salvajes. La infección de células Vero con tripomastigotes salvajes se realizó como se describe en Materiales y Métodos. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas.

Los tripomastigotes transfectantes fueron pre incubados en medio DMEM en ausencia o presencia de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ Tetraciclina y 100 μM NAM (inhibidor de sirtuinas [152]) y luego utilizados para infectar células Vero en una relación 10:1 (10 parásitos por célula). Después de seis horas de infección a 37 $^{\circ}\text{C}$, se lavaron los tripomastigotes libres, se agregó DMEM con o sin Tetraciclina y se mantuvo el cultivo por dos días.

La observación de células Vero teñidas con Giemsa mostró que el tratamiento de tripomastigotes no inducidos con NAM [(-/-, +NAM) vs (-/-)] causó una reducción significativa en el porcentaje de células infectadas (en concordancia con lo reportado por Soares y colaboradores [153] (Figura 48A). La sobreexpresión de ambas sirtuinas protegió a los tripomastigotes del efecto negativo de la NAM [(+/+, +NAM) vs (-/-, +NAM)]. Estos resultados sugieren que la actividad de las sirtuinas es necesaria para una infección efectiva de células de mamíferos. Para analizar el efecto de la sobreexpresión de las sirtuinas en la tasa de infectividad de tripomastigotes, nos centramos en la condición (+/-), en la cual la expresión se indujo solo en los tripomastigotes durante la infección. Como se puede ver en la figura 48A, la sobreexpresión de TcSIR2RP1HA

incrementa la tasa de infectividad [(+/-) vs (-/-)], mientras que la de TcSIR2RP3HA la disminuye un poco [(+/-) vs (-/-)]. Por otro lado, para evaluar el efecto de la sobreexpresión en la proliferación de amastigotes intracelulares (Figura 48B), nos centramos en la condición en la cual solo agregamos Tetraciclina post-infección, por 48 horas luego de lavar los tripomastigotes (-/+). El número de amastigotes por célula infectada disminuye al sobreexpresar TcSIR2RP1HA, pero incrementa por TcSIR2RP3HA [(-/+) vs (-/-)]. La reducción en el número de amastigotes cuando la expresión de TcSIR2RP3HA se indujo durante la infección [(+/-) vs (-/-)], puede ser una consecuencia de la infectividad disminuída o puede indicar que la sobreexpresión de esta enzima en el estadio tripomastigote resulta en una diferenciación ineficiente a amastigotes, retrasando así la replicación de amastigotes. En contraste, cuando se induce en todo momento (+/+), la sobreexpresión en amastigotes incrementa la proliferación de estos, escondiendo el retraso en la diferenciación de tripomastigote a amastigote.

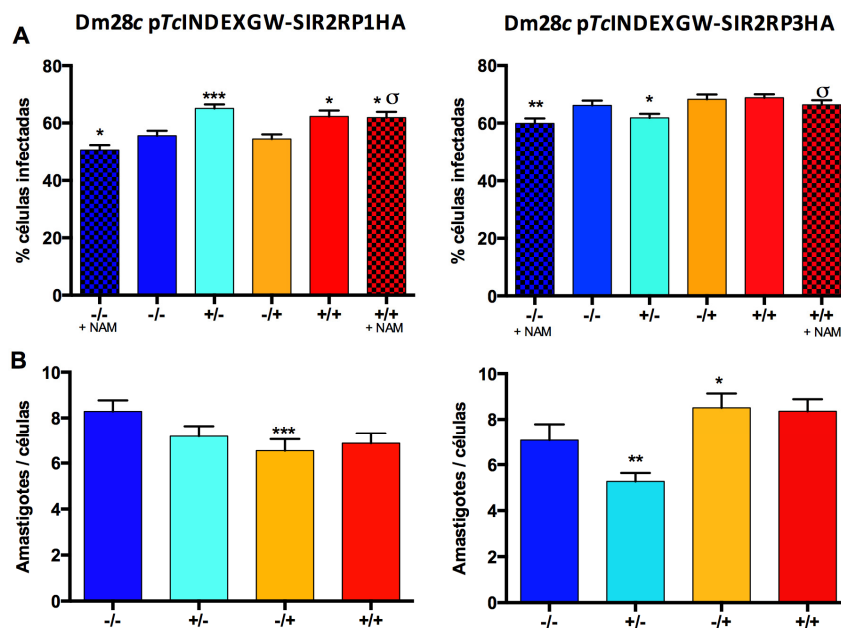


Figura 48: La sobreexpresión de las sirtuinas afecta la infección de células Vero. Se ensayaron múltiples condiciones: (-/-), nunca se agrega Tetraciclina al medio, no hubo inducción; (+/-), los tripomastigotes se pre trataron con Tet por 3 horas antes de la infección, y también se agregó tet durante la infección, pero luego se lavó; (-/+), no hubo inducción en los tripomastigotes, se agregó Tet por 48 horas al estadio amastigote; (+/+), los tripomastigotes fueron pre tratados y se agregó Tet durante todo el experimento. Las condiciones (-/-) y (+/+) también se ensayaron en presencia de 75 μ M Nicotinamida (+ NAM). El porcentaje de células infectadas (A) y el número de amastigotes por célula (B) se determinaron contando células teñidas con Giemsa en un microscopio óptico. Los resultados se expresan como la media \pm desvío estándar de triplicados, y representan uno de tres experimentos independientes. Cada condición se analizó por Mann-Whitney con el control (-/-): * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$. El mismo análisis

estadístico se utilizó para comparar los resultados del tratamiento con NAM (-/-, +NAM y +/-, +NAM): σ $p < 0.05$.

III.11. La sobreexpresión de TcSIR2RP1 y TcSIR2RP3 protege al parásito del tratamiento con inhibidores de sirtuinas.

Las sirtuinas son consideradas biocatalizadores fundamentales para la vida y en algunas condiciones se ha visto que promueven la supervivencia [189]. Por lo tanto, hay un interés creciente en las sirtuinas como blancos terapéuticos. Se han reportado numerosas estructuras de complejos de sirtuinas con sus inhibidores [125,190]. En este trabajo, testeamos tres inhibidores de sirtuinas: Nicotinamida (NAM) [153], Cambinol y EX-527 [191]. Todos ellos exhibieron una inhibición dependiente de la concentración en cultivos axénicos. Los valores de IC_{50} obtenidos para cada compuesto se muestran en la tabla VII. El IC_{50} de EX-527 es significativamente mayor que el de los otros. Dado que EX-527 es un potente y selectivo inhibidor de *HsSIRT1*, con un IC_{50} reportado de 0.1-1 μ M [191], la baja toxicidad observada sugiere que ninguna de las sirtuinas presentes en *T. cruzi* está relacionada a *HsSIRT1*, consistente con nuestro análisis filogenético. Por el contrario, NAM y Cambinol exhiben valores de IC_{50} del mismo orden a los obtenidos *in vitro* para sirtuinas purificadas de otros organismos como: NAM IC_{50} para *PfSIR2*: 51.2 μ M [192], NAM IC_{50} para *HsSIRT5*: 46.6 μ M, *HsSIRT1*: 50-100 μ M, *HsSIRT3*: 30 μ M; Cambinol IC_{50} para *HsSIRT1*: 56 μ M, *HsSIRT2*: 59 μ M [193].

Consideramos la posibilidad de que las líneas transgénicas estén protegidas o sean menos sensibles a los inhibidores de sirtuinas. Para evaluar esta hipótesis, ambas líneas fueron tratadas por los inhibidores en ausencia o presencia de Tetraciclina. Como se puede observar en la figura 49, la sobreexpresión de las sirtuinas protege a los epimastigotes de la inhibición en el crecimiento ocasionada por NAM y Cambinol. También calculamos los valores de IC_{50} de estos dos inhibidores en las cepas sobreexpresantes. Los valores obtenidos se muestran en la tabla VI, como era de esperar son mayores a los obtenidos en la cepa salvaje.

	Nicotinamida	Cambinol	EX-527
Dm28c salvaje	61.33	85.61	206.2
Dm28c SIR2RP1HA + Tet	97.58	135.8	ND
Dm28c SIR2RP3HA + Tet	81.72	123.1	ND

Tabla VI: valores de IC_{50} (μ M). ND: no determinado

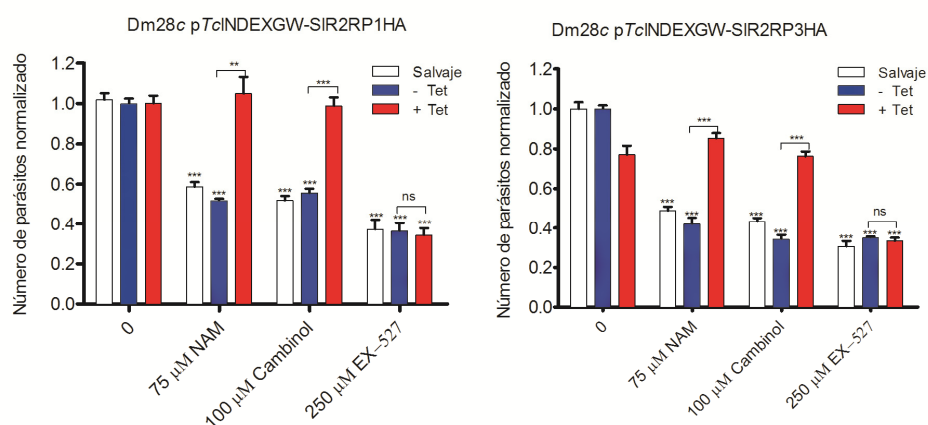


Figura 49: Dm28c salvaje (barras blancas) y ambas cepas transgénicas (Dm28c pTcINDEXGW-SIR2RP1HA y SIR2RP3HA) sin inducir (barras azules) e inducidas (barras rojas) fueron tratadas con tres inhibidores de sirtuinas con concentraciones por encima de sus valores de IC_{50} : 75 μ M Nicotinamida, 100 μ M Cambinol Y 250 μ M EX-527. El experimento se realizó en triplicado y el número de parásitos se determinó a las 72 horas contando células viables. Los valores obtenidos fueron normalizados a la cepa salvaje sin inhibidor. La tasa de crecimiento de cada línea con los inhibidores se comparó con el de la misma línea sin inhibidor. También comparamos la viabilidad de las líneas inducidas y sin inducir para cada compuesto. La barra representa la media \pm el desvío estándar * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ (T de Student, no paramétrico).

III.11. TcSIR2RP3 está involucrada en la respuesta al estrés oxidativo.

Considerando que a muchas sirtuinas se les atribuyen funciones antioxidantes y que TcSIR2RP3 se localiza en la mitocondria, probamos la sensibilidad de la cepa transgénica para TcSIR2RP3HA ante compuestos que generan radicales libres como: peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y Nifurtimox (NFX). También tratamos con Beznidazol (BZL). Como se puede observar en la figura 50, al inducir la sobreexpresión de TcSIR2RP3, los parásitos son más resistentes al tratamiento con H_2O_2 y Nifurtimox y exhiben IC_{50} más altos que la cepa sin inducir o la salvaje (Tabla VII). Esto no ocurre con el tratamiento con Beznidazol, el cual tiene un mecanismo de acción diferente.

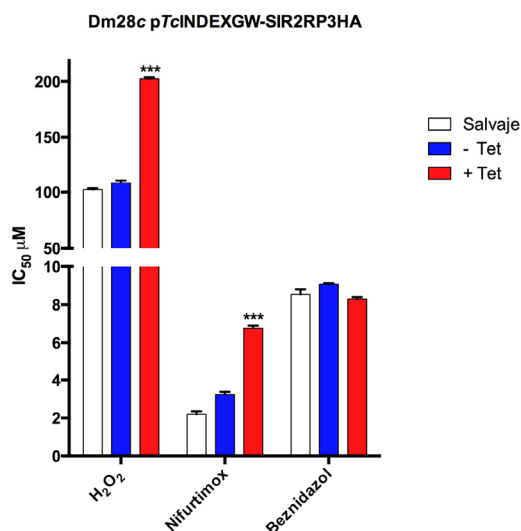


Figura 50: Los epimastigotes se sometieron a distintas concentraciones de cada uno de los compuestos por 5 días. Luego se contó el número de parásitos y se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración por triplicado. Los resultados se analizaron por regresión no lineal con el GraphPad Prism 6.0 para calcular los valores de IC₅₀.

	H ₂ O ₂	Nifurtimox	Beznidazol
Dm28c salvaje	100.8	2.1	8.9
Dm28c SIR2RP3HA - Tet	112	3.5	9
Dm28c SIR2RP3HA + Tet	201.9	6.9	8.2

Tabla VII: valores de IC₅₀ (μM).

DISCUSION

La expresión *TcSIR2RP1* y *TcSIR2RP3* está regulada a lo largo del ciclo de vida de *T. cruzi*. El hecho de que las dos sirtuinas presenten una expresión diferencial a lo largo del ciclo de vida sugiere que los niveles de acetilación podrían jugar un rol en la regulación de la biología de las formas evolutivas del parásito. Es destacable que el patrón de expresión de las sirtuinas exógenas inducidas por Tetraciclina se asemeje al de las enzimas endógenas. Esta observación sugiere que los niveles proteicos podrían estar regulados por un mecanismo post transcripcional independiente de las regiones 3' y 5' no codificantes, las cuales están ausentes en las construcciones del pTcINDEX-GW o por mecanismos post traduccionales.

Nuestros resultados claramente demuestran que *TcSIR2RP1* y *TcSIR2RP3* son enzimas citoplasmática y mitocondrial respectivamente. Esto era de esperar ya que ambas proteínas carecen de la porción N-terminal responsable de la localización nuclear de *ScSir2* y otras sirtuinas relacionadas. Sin embargo, la posibilidad de que bajo ciertas

condiciones sean importadas al núcleo temporariamente por una vía de direccionamiento alternativa no se puede descartar.

Considerando su localización citoplasmática, TcSIR2RP1 parece estar más relacionada a su ortóloga de *Leishmania* que a la de *T. brucei*, aunque TbSIR2RP1 es más similar a nivel de secuencia (68% de identidad) que LmSIR2RP1 (55% de identidad). El hecho que *T. brucei* tenga una sirtuina nuclear ausente en los otros TriTryps se puede explicar por algunas diferencias conocidas entre estas especies. TbSIR2RP1 participa del silenciamiento epigenético de las regiones teloméricas transcritas por la ARN polimerasa I, mientras que nada similar ocurre en *T. cruzi* o *Leishmania*. En *P. falciparum*, una sirtuina nuclear (PfSIR2A) filogenéticamente no relacionada a TbSIR2RP1, también esta implicada en el silenciamiento de genes teloméricos. En conjunto, estos datos sugieren que la participación de una sirtuina en la deacetilación de histonas representa la excepción, asociada al silenciamiento telomérico, en lugar de la regla en cuanto a la función de las sirtuinas en estos organismos, y podría ser un ejemplo de evolución convergente.

Más allá de su localización celular y modo de acción, las sirtuinas son consideradas reguladores pro-sobrevida. Estas funciones están relacionadas al uso del NAD⁺ como sustrato, el cual junto con la acetil-CoA, el sustrato de las Acetiltransferasas, son considerados sensores del estado energético de la célula. Las sirtuinas nucleares, como HsSIRT1, regulan la respuesta transcripcional al hambre o el estrés redox y bajo ciertas condiciones, sirtuinas citoplasmáticas y mitocondriales se importan al núcleo con el mismo propósito (revisado en [133]). Dado que la regulación transcripcional está ausente en *T. cruzi*, sería razonable pensar que solo las funciones no nucleares de estas enzimas estarán presentes. Una de las funciones de HsSIRT2 citoplasmática es deacetilar la Fosfoenol piruvato carboxikinasa, aumentando su estabilidad en ausencia de glucosa [103]. Ante la restricción calórica, las sirtuinas humanas mitocondriales también regulan la gluconeogénesis a través de la Glutamato deshidrogenasa, una enzima que convierte glutamato a α -cetoglutarato, controlando así la producción de glucosa a través del ciclo TCA [194-196]. HsSIRT3 disminuye la producción de especies reactivas del oxígeno al estimular la actividad de la Superoxido dismutasa 2, y favorece la respiración celular al incrementar las actividades del complejo I, complejo II (vía la Succinato deshidrogenasa), complejo III y de la Isocitrato deshidrogenasa 2, afectando el metabolismo de glucosa y lípidos. Finalmente, la HsSIRT3 también estimula la β -oxidación y la formación de cuerpos cetona al activar la Acyl CoA deshidrogenasa de cadena larga y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 2. A pesar de que se requieren

más estudios para determinar si las sirtuinas de trypanosomas comparten estas funciones, algunos de nuestros resultados se pueden interpretar bajo este contexto: TcSIR2RP1 favorece la metacicloogénesis, un proceso de diferenciación inducido por el hambreado del parásito [197-198]. La infectividad aumentada de esta cepa se parece a lo observado por Sereno y colaboradores con LmSIR2RP1 [199]. Dado que detectaron a esta sirtuina en la fracción secretada de los parásitos, construyeron fibroblastos que sobreexpresan LmSIR2RP1, los cuales resultaron más permisivos hacia la invasión por *Leishmania*. Estos resultados sugieren una función para las sirtuinas citoplasmáticas en la relación huésped-parásito. En contraste, TcSIR2RP3 parece no estar implicada en la metacicloogénesis o la infección celular, pero si favorece la duplicación de amastigotes intracelulares, lo cual ocurre en un ambiente oxidante, sugiriendo la participación de esta enzima en la respuesta al estrés oxidativo. En efecto, la cepa sobreexpresante resultó más resistente al tratamiento con compuestos que generan radicales libres.

La actividad de las sirtuinas en la protección de las células al estrés y al hambreado, incrementando así su sobrevivencia, llevó a establecer su rol en la proliferación celular. Actualmente, muchos inhibidores de sirtuinas están siendo ensayados contra diferentes tipos de cáncer. Por otro lado, activadores de sirtuinas son considerados como potenciales drogas anti-envejecimiento. También se propuso a las sirtuinas como blancos prometedores para el desarrollo de drogas contra Trypanosomas, *Plasmodium* y *Leishmania*, y varios inhibidores bien caracterizados han demostrado actividad anti-parasitaria [144,200-202].

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante este trabajo constituyen un aporte al conocimiento sobre los procesos mediados por acetilación en *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Como primera aproximación se identificó el acetiloma de *T. cruzi* utilizando el método ampliamente utilizado en los últimos años para muchos otros organismos: enriquecimiento de péptidos acetilados por inmutafinidad seguido de espectrometría de masas de alta resolución. Al igual que en los acetilomas ya reportados, las proteínas identificadas se distribuyen en todos los compartimentos celulares y están involucradas en una gran variedad de funciones celulares, más allá de las nucleares. El número de proteínas acetiladas (150) en *T. cruzi* es más cercano al de *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum*, y es consistente con lo que uno esperaría para un protozoo. A pesar de que el número de proteínas acetiladas detectadas depende de la profundidad del análisis, los datos presentados sugieren fuertemente que la acetilación es una modificación crítica encontrada en todos los reinos y que hay una presión selectiva para mantener esta actividad aun después de una adaptación a vida parasitaria [83].

En segunda instancia, se caracterizó el Factor con Bromodominio 1 de *T. cruzi* (TcBDF1), una proteína que posee una expresión diferencial en los estadios del ciclo de vida: es más abundante en el estadio infeccioso (tripomastigotes) que en los reproductivos (epimastigotes y amastigotes). Analizamos su localización intracelular en epimastigotes utilizando diferentes técnicas y concluimos que se concentra en los glicosomas, dirigido por una señal de transporte peroxisomal tipo II (PTS-2), lo cual se confirmó contruyendo fusiones a una proteína fluorescente. La existencia de mecanismos bioquímicos de regulación para las vías metabólicas del glicosoma ha sido propuesto por numerosos autores, sin embargo ninguno fue descrito hasta el momento [31,203]. Nuestras observaciones, sumadas al hecho de que la acetilación de proteínas metabólicas ha sido descrita en diversos tipos celulares y que en nuestro estudio del acetiloma de *T. cruzi* identificamos proteínas metabólicas del glicosoma, nos permiten proponer que TcBDF1 forma parte de un complejo proteico glicosomal que participaría en la regulación de la acetilación de distintas proteínas presentes en esta organela, modulando la actividad metabólica de la misma, el importe de proteínas o la biogénesis de la organela.

Por otro lado, mediante técnicas de genética reversa, se obtuvieron líneas de epimastigotes sobreexpresantes para diferentes construcciones de TcBDF1. Analizamos el efecto de la sobreexpresión de TcBDF1 salvaje y mutante en cuanto a la morfología y

ultraestructura celular de los parásitos y también realizamos curvas de crecimiento, ensayos de metaciclologénesis e infecciones *in vitro*. La sobreexpresión de la proteína salvaje produce epimastigotes con morfología aberrante que casi no se replican y no se diferencian correctamente a tripomastigotes metacíclicos, pero hace que los tripomastigotes extracelulares sean más infectivos. En cambio, la sobreexpresión de la proteína con una doble mutación puntual en el sitio de unión de la lisina acetilada, no afecta el crecimiento de epimastigotes ni la metaciclologénesis *in vitro*.

Por último, caracterizamos la dos proteínas homólogas a ScSir2 presentes en *T. cruzi*. Estas son deacetilasas NAD⁺ dependientes, cuyos dominios catalíticos y de unión a NAD⁺ están conservados. La expresión de estas enzimas está diferencialmente regulada entre los distintos estadios: TcSIR2RP1 es más abundantes en epimastigotes y amastigotes que en tripomastigotes, mientras que la expresión de TcSIR2RP3 es mayor en epimastigotes que en amastigotes y en tripomastigotes no fue detectada en las condiciones ensayadas. Nuestros resultados claramente demuestran que TcSIR2RP1 y TcSIR2RP3 son enzimas citoplasmática y mitocondrial, respectivamente. En este caso, también obtuvimos cepas transfectantes que sobreexpresan las versiones salvajes de estas proteínas. Con estas líneas se realizaron curvas de crecimiento, ensayos de metaciclologénesis e infecciones *in vitro*. A estas cepas también se les analizó su morfología, ultraestructura celular y susceptibilidad a inhibidores de sirtuinas. TcSIR2RP1 favorece la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes y estos resultan más infectivos, pero no tiene ningún efecto sobre la duplicación de epimastigotes. En cambio, TcSIR2RP3 modifica el crecimiento de epimastigotes pero no afecta su morfología ni su tasa de metaciclologénesis. La capacidad infectiva de los tripomastigotes se ve levemente disminuída pero la tasa de duplicación de los amastigotes intracelulares aumentada. TcSIR2RP3 estaría involucrada en la respuesta al estrés oxidativo. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la actividad de las sirtuinas es importante para la proliferación de las formas replicativas, para la interacción huésped-parásito y para la diferenciación entre los distintos estadios, pero cada una está involucrada en diferentes procesos.

Como ocurre en otros protozoos, los procesos mediados por acetilación son importantes en *Trypanosoma cruzi*. Se observó en otros tripanosomátidos que las enzimas encargadas de deacetilar diversos blancos son necesarias para su supervivencia [136-137]. Además, se ha demostrado que inhibidores de deacetilasas de distintas clases son efectivos contra *Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* y *Trypanosoma brucei* [146-149]. Como ya se mencionó, las HDACs son un blanco ampliamente validado

como estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer. Su actividad anti-proliferativa se da tanto a través de la interferencia con el remodelado de la cromatina así como mediante la alteración del estado de acetilación de proteínas no-histonas claves para distintos procesos celulares [145]. El número de inhibidores de deacetilasas que son aprobados y entran al mercado para el tratamiento de tumores se encuentra en aumento continuamente y sería muy importante evaluar su actividad contra distintos parásitos. Los resultados presentados contribuyen al conocimiento de la localización y función de estas enzimas y las cepas sobreexpresantes de sirtuinas contruídas en este trabajo pueden ser herramientas útiles para ensayar inhibidores de sirtuinas.

MATERIALES Y METODOS

HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS

Bases de datos

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

Análisis de secuencias

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

- Para la predicción de dominios se utilizó el servidor Pfam (<http://pfam.xfam.org>).
- Para determinar porcentajes de identidad y similitud entre pares de proteínas y realizar alineamientos múltiples se utilizó el programa ClustalX. Los alineamientos múltiples se editaron con BioEdit o en línea con el programa ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).
- Para la predicción y alineamientos de estructuras secundarias se utilizó el programa Modeller (<https://salilab.org/modeller/>) y el servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Para la predicción de localización subcelular se utilizaron los servidores en línea Wolf pSORT (<http://wolfpsort.org>), pSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) y PeroxisomeDB (<http://www.peroxisomedb.org/home.jsp>).

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

MEDIOS DE CULTIVOS Y CEPAS

Medios y cepas bacterianas

Para el cultivo y mantenimiento de cepas bacterianas se utilizó el medio Luria Bertani (LB) [204], cuya composición por litro es: 10 g de peptona de carne, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Según el caso se utilizaron los siguientes antibióticos:

Ampicilina (100 µg/ml) y Kanamicina (50 µg/ml). Para la preparación de medios sólidos se agregó agar en concentración final de 15 g/l.

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

Cepa	Genotipo
XL1 Blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)</i>
DH5α	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-</i>
BL21 pLys S	<i>F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal [lon] (DE3 immP21 int-lacI+lacUV5::lacZ::T7 RNapolimerasa) [pLys S camr]</i> <i>F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal [lon] (DE3 immP21 int-lacI+lacUV5::lacZ::T7 RNapolimerasa) [pLys S camr]</i>
GM119	<i>F-supE44 lacY1 galK2 galT22 metB1 dam-3 DCM TSX-6-78-λ</i>

Tabla VIII: Tabla de cepas bacterianas utilizadas

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

Medios y cepas de *Trypanosoma cruzi*

Para el cultivo de epimastigotes se utilizó medio LIT (del inglés “Liver Infusion Tryptose”) que contiene por litro: 5 g de infusión de hígado; 4 g de NaCl; 0,4 g de KCl; 5 g de triptosa; 8 g de Na₂HPO₄ anhidro y 4 g de glucosa, complementado con 1250 µl de solución de hemina (20 mg/ml en NaOH 0.2N) y 15 g de extracto de levadura por litro. Luego de autoclavar se agregó 10% de suero fetal bovino, Penicilina (100 U/ml) y Estreptomicina (0,1 mg/ml).

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

Para inducir el proceso de metacicloogénesis en la cepa Dm28c se utilizó el medio TAU (del inglés “Triatomine Artificial Urine”) compuesto por: CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2mM, NaHCO₃ 0,035%, NaCl 190 mM, KCl 17 mM, NaH₂PO₄ 15 mM, Na₂HPO₄ 0,47 mM y H₂O csp 1 litro.

El mismo se llevó a pH 6.5 con NaH₂PO₄ 2 M y se esterilizó por filtrado. También se utilizó el medio TAU3AA que está compuesto por TAU con el agregado de Glucosa (10 mM), ácido L- aspártico (2 mM), ácido L- glutámico (50 mM) y L- prolina (10 mM), el cual se esterilizó por filtrado.

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

Cepa	Características
CL Brener	Clon de referencia del Proyecto Genoma de <i>T. cruzi</i> , aislada en Rio Grande do Sul (Brasil) de <i>Triatoma infestans</i> . Perteneciente a la DTU IIe [2].
Dm28c	Cepa aislada de la comadreja <i>Didelphis marsupialis</i> . Perteneciente a la DTU I [205]. Su genoma fue secuenciado en 2014 [206].

Tabla IX: Cepas de *Trypanosoma cruzi*.

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

TECNICAS DE CULTIVO DE *T. CRUZI*

Infecciones *in vitro*

Se cultivaron células Vero hasta sub-confluencia (30-40% de confluencia) en frascos de cultivo de 25 o 75 cm³, utilizando medio de cultivo DMEM con el agregado de SFB 10%. Luego fueron infectadas con tripomastigotes de la cepa Dm28c (8x10⁵ parásitos en los frascos de 25 cm³ y 25x10⁵ parásitos en los frascos de 75 cm³). Se incubaron durante 5 horas a 37°C, se lavaron con PBS para separar los parásitos que no ingresaron a las células y se les agregó medio de cultivo nuevo (DMEM con SFB 10%). Se incubaron a 37°C hasta el día siguiente, que se lavaron con PBS y se les cambió el medio por DMEM con 2% SFB. A las 48 horas post-infección ya se observa la presencia de amastigotes en el citoplasma de las células. Se continúa el proceso de infección hasta el día 5 o 6 donde comienzan a aparecer los tripomastigotes en el espacio extracelular al liberarse por la lisis de las células infectadas.

Para los ensayos de infección *in vitro* de las distintas cepas se utilizan tripomastigotes obtenidos luego de dos rondas de infección. Se colectaron del sobrenadante celular de cultivos previamente infectados centrifugando a 2.000 x g a temperatura ambiente por 10 minutos y se incubaron 3 horas a 37°C para que los tripomastigotes se muevan del pellet al sobrenadante. Luego de contar el número de tripomastigotes en cámara de Neubauer, se pre-incubaron en ausencia o presencia de 0.25 µg/ml Tetraciclina durante 3 horas a 37°C y se utilizaron para infectar monocapas de células Vero en una

proporción de 10 a 25 parásitos por célula en DMEM suplementado con 2% SFB en ausencia o presencia de 0.25 µg/ml Tetraciclina. Luego de 6 a 16 horas de infección a 37°C, los tripomastigotes libres se removieron del medio con múltiples lavados con PBS. Los cultivos se incubaron con medio completo en ausencia o presencia de 0.25 µg/ml Tetraciclina por dos días post-infección. La células se fijaron con metanol y el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula se determinaron contando ~1000 células por cubreobjeto luego de la tinción con Giemsa.

Obtención de amastigotes

Se utilizaron frascos que se encontraban en el segundo día post-infección (se observaban los citoplasmas de las células Vero con formas no móviles del parásito). Se colocaron las botellas sobre hielo y se lavaron con PBS frío. Se desprendió la monocapa por ruptura mecánica utilizando un raspador de células. Luego se colectaron las células por centrifugación a 1.000 x g por 10 minutos. Se lavó el pellet con PBS frío, siempre manteniendo en hielo, y luego se pasó diez veces a través de una jeringa de tuberculina para facilitar la ruptura celular. En cada paso se fue observando al microscopio para verificar la presencia de amastigotes. Finalmente se centrifugó a 1.000 x g por 10 minutos y el sedimento obtenido se utilizó para preparar láminas para inmunofluorescencia o se conservaron a -70°C hasta su utilización para la preparación de extractos.

Alternativamente, se realizaron infecciones sobre cubreobjetos circulares estériles en placas de 24 pocillos. Por cada pocillo se agregaron 3.000 células Vero. Luego de 48 horas, se obtuvieron células sub-confluentes, y se realizó la infección con $3-7,5 \times 10^4$ tripomastigotes por pocillo. Luego de 48 horas post-infección los pocillos fueron lavados con PBS y fijados con para-formaldehído 4% por 20 minutos o metanol durante 5 minutos. Luego del paso de fijación, los pocillos fueron lavados con PBS dos veces y los cubreobjetos conteniendo las células fijadas sobre ellos se conservaron en PBS hasta su posterior utilización para inmunofluorescencia o tinción con el colorante Giemsa.

Obtención de tripomastigotes

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

centrifugaron para conservar a -70°C hasta su utilización para la preparación de extractos.

Obtención de tripomastigotes metacíclicos (metacicloogénesis *in vitro*)

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

Tinción con colorante Giemsa

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

Contaje de células

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

Tratamiento de epimastigotes de *T. cruzi* con compuestos

Para determinar los valores de IC_{50} de los inhibidores de sirtuinas (NAM, Cambinol y EX-527), del Beznidazol y de los compuestos que generan radicales libres (H_2O_2 y Nifurtimox), los epimastigotes de las distintas cepas se cultivaron a 28°C en LIT suplementado con 10% SFB en ausencia o presencia de $0,5 \mu\text{g/ml}$ Tetraciclina y con distintas concentraciones de los compuestos, por triplicado. El crecimiento celular se determinó luego de 72 horas de cultivo, contando las formas viables con el contador

hematológico automatizado (W19 Counter AA de Weiner Lab) adaptado para conteo de epimastigotes.

Análisis estadístico

De todos los experimentos se realizaron al menos tres independientes, cada uno con triplicados. Los datos se presentan como la media \pm el desvío estándar. El análisis estadístico se realizó por T de Student, Mann-Whitney no paramétrico y ANOVA. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron significativas si: $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**), $p < 0,001$ (***) y $p < 0.0001$ (****). Para determinar los valores de IC_{50} ajustamos las curvas mediante regresión no lineal con el programa GraphPad Prism 6.0.

TECNICAS PARA EL TRABAJO CON PROTEINAS

Expresión de proteínas en *E. coli*

Condiciones generales de inducción y obtención de extractos proteicos.

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

Purificación de proteínas fusionadas a poli-histidina en condiciones desnaturalizantes

Una vez solubilizadas las proteínas en Solución A (Tris-HCl 10 mM pH 8, Urea 8 M, EDTA 10 mM, Tritón X-100 1%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 10 mg/ml, aprotinina 1 mg/ml, leupeptina 3 mg/ml) se enfrentaron 3 veces con columnas de matriz Ni^{2+} -agarosa equilibrada con Solución B (NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 M, ajustado a pH 8 con NaOH), con la cantidad de matriz recomendada por el proveedor (Qiagen). Luego se realizaron 2 lavados con 4 ml de Solución C (NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 M, ajustado a pH 6,3 con HCl). Posteriormente las proteínas se recuperaron de la

columna con solución D (NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 M, ajustado a pH 5,9 con HCl) y solución E (NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, Urea 8 M, ajustado a pH 4.5 con HCl), colectando fracciones de 500 μl . Luego de la purificación, las fracciones se concentraron utilizando filtros para centrifugación Centriprep YM-10 o Ultrafree-MC (Millipore, Amicom Inc.).

Cuantificación de proteínas

Para cuantificar proteínas se utilizó Ácido bicinónico y sulfato de cobre pentahidratado en una relación 50/1. Se preparó una curva de calibración con BSA, a 50 μl de muestra (incógnita y curva) se le agregó 150 μl de mezcla de reactivos y se incubó por 20 minutos a 37°C. Luego se midió absorbancia a 630 nm y se determinó el contenido proteico de la muestra incógnita a partir de la curva de calibración de BSA. Alternativamente se utilizó el kit comercial “BioRad Protein Assay” según las indicaciones del fabricante.

Inmunización de conejos para obtención de anticuerpos

Las proteínas de fusión purificadas se electroeluyeron y se inyectaron en conejos en forma subcutánea con 100 μg de proteína (1:1) en adyuvante de Freund's completo (Sigma) y con dos refuerzos de 50 μg de proteína en adyuvante incompleto con intervalos de 14 días. Los conejos se sangraron y los sueros se obtuvieron por centrifugación después de dejar coagular la sangre por 2 horas a 37°C [207].

Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos se purificaron a partir de suero de conejo obtenido por inmunización de dichos animales con las proteínas recombinantes. Para la purificación se procedió a incubar la proteína recombinante inmovilizada en membrana de nitrocelulosa con el suero, en agitación, durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó con 30 volúmenes de PBS. Los anticuerpos anti-TcBDF1, anti-TcSIR2RP1 y anti-TcSIR2RP3 se eluyeron en cinco alícuotas de 500 μl de trietilamina 0,1 M pH 11,5, las cuales se neutralizaron inmediatamente con HCl 0,3 M. Los anticuerpos se concentraron en columnas de centricon (Millipore) o directamente se conservaron a -20°C con el agregado de 50% de glicerol.

Extractos proteicos de *Trypanosoma cruzi*

Extractos proteicos totales

Se utilizaron 10 ml de cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial (2×10^7 parásitos/ml). Alternativamente, se utilizaron amastigotes o tripomastigotes

purificados. El cultivo se colectó por centrifugación a 3.000 x g por 10 minutos y se lavó con PBS dos veces. El sedimento se resuspendió en 200 µl de tampón de lisis Urea (Hepes 20 mM pH 8, Urea 8 M) y tampón de siembra. La muestra se hirvió por 5 minutos y se centrifugó 15 minutos a 15.000 x g.

Extractos nucleares y no nucleares

Se colectaron parásitos en fase exponencial de crecimiento, a 3.000 rpm por 10 minutos. Se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml (cada $1-5 \times 10^8$ parásitos) de tampón de lisis A y se incubaron en hielo durante 45 minutos aproximadamente, hasta observar la lisis al microscopio.

Luego se agregó glicerol al 5% V/V y se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, quedando los núcleos en la fase insoluble (la fase soluble corresponde al extracto de proteínas no nucleares). Éstos fueron lavados e incubados en hielo durante 10 minutos con 500 µl de tampón de lisis B. Luego se centrifugaron a 2.000 rpm por 10 minutos a 4°C y la fase insoluble se resuspendió e incubó en hielo durante una hora en 400 µl de tampón C. La lisis de los núcleos fue favorecida sonicando con dos pulsos de 10 segundos con potencia de 25%. La extracción con el buffer C se realizó al menos dos veces. Se recogió el sobrenadante conteniendo las proteínas nucleares y se precipitó con TCA 20% durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos a 4°C. El pellet se lavó con acetona y se dejó secar. Luego se resuspendió en tampón de siembra para SDS-PAGE.

Tampón de lisis A: 10 mM HEPES pH 7,9, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.1% v/v Nonidet p-40, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinina.

Tampón de lisis B: 10 mM HEPES pH 7,9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 5%v/v Glicerol, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinina.

Tampón C: 10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM HEPES pH 7,9, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5% v/v Glicerol, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinina.

Fraccionamiento subcelular con digitonina

Se cosecharon epimastigotes en fase exponencial de crecimiento (1×10^7 parásitos/ml), se lavaron con tampón STE (Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7,4, EDTA 1 mM) frío dos veces y se resuspendieron a un concentración final de 10 mg/ml de proteína celular. La digitonina se disolvió en STE a baño maría (2 mg/ml) y se diluyó en cantidades decrecientes. Se prepararon los tubos de reacción incubando los extractos celulares con distintas concentraciones de digitonina, por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C) e

inmediatamente se colocaron en hielo y se centrifugaron 3 minutos a 15.000 x g a 4°C para separar las fracciones solubles que se utilizaron para medir las actividades enzimáticas. Luego los extractos se conservaron a -70°C hasta su utilización. En paralelo se procesó un tubo con tampón de lisis en presencia de Tritón X-100 0,1% como control de lisis total.

Medida de actividad Malato deshidrogenasa: *T. cruzi* presenta una isoforma de la enzima de localización glicosomal y otra de localización mitocondrial, por lo que la medida de actividad permite conocer a qué fracción corresponde observando el aumento de la actividad enzimática a medida que mayores cantidades de enzimas son liberadas a partir de las organelas. Para medir la actividad malato deshidrogenasa en los extractos obtenidos, se incubaron 5 µl de NADH 0,5 mM, 10 µl de Oxalacetato 1 mM, 2 µl de Tritón X-100 20% y 20 µl de extracto en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8. El porcentaje de actividad se determinó espectrofotométricamente a través de la medida de la oxidación del NADH ($\epsilon_{339\text{nm}}=6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 340 nm.

Medida de actividad α -Hidroxi-ácido deshidrogenasa: *T. cruzi* presenta una enzima de localización citosólica. Para medir la actividad α -Hidroxi-ácido deshidrogenasa en los extractos obtenidos, se incubaron 4 µl de NADH 0,5 mM, 7 µl de Fenilpiruvato 1 mM, 2 µl de Tritón X-100 20% y 40 µl de extracto en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8. El porcentaje de actividad se determinó espectrofotométricamente a través de la medida de la oxidación del NADH ($\epsilon_{339\text{nm}}=6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 340 nm.

Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial

A partir de un cultivo de 200-400 ml, se colectaron parásitos en fase de crecimiento exponencial, a 2.000 x g por 10 minutos. Se lavaron dos veces con tampón de homogeneización y se resuspendieron en 1 ml de tampón de homogeneización (25 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 0.25 M sacarosa y 1 mM PMSF). Los parásitos fueron lisados por abrasión en un mortero frío conteniendo la mezcla de parásitos con carburo de silicio (600 mesh) en una relación 1:1. El lisado se diluyó 1/5 con tampón de homogeneización y se centrifugó a 100 x g durante 10 minutos para remover el carburo de silicio. El homogenado luego se sometió a una centrifugación diferencial: a 1.000 x g durante 15 minutos se obtuvieron los núcleos y las células sin romper (fracción N), a 5.000 x g durante 15 minutos, los gránulos grandes (fracción GG), a 21.460 x g durante 20 minutos, los gránulos pequeños (fracción GP) y a 139.000 x g durante 1 hora en una ultracentrífuga Beckmann con el rotor Ti. 90, se obtuvieron los microsomas y glicosomas (fracción M).

Finalmente, todos los sedimentos se resuspendieron con 100 μ l de tampón de lisis Urea (Hepes 20 mM pH 8, Urea 8 M).

Separación de proteínas mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

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

Electro-elución de proteínas a partir de geles de acrilamida

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

Western blot

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

Inmunocitocalización

Parásitos previamente colectados y lavados con PBS se resuspendieron en 1 ml de PBS y se adhirieron por 20 minutos en portaobjetos tratados con Poli Lisina 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 30 minutos a 37°C. Luego se fijaron con formaldehído 3,7% en PBS por 20 minutos, se incubaron con Tritón X-100 0,2% en PBS por 10 minutos para permeabilizar y se lavaron con PBS 2 veces. A continuación se incubaron con el anticuerpo primario específico diluido en PBS-BSA 5% por 2 horas (para los experimentos de co-localización se incubaron simultáneamente los dos anticuerpos primarios). Se lavaron con PBS-Tween 0,01% 2 veces y luego se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, de ratón o de rata conjugados a fluoresceína, Cy3 o rodamina (para los experimentos de co-localización se incubaron con los dos anticuerpos secundarios al mismo tiempo) junto con 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI). Finalmente se lavaron con PBS Tween 0,01% en PBS 2 veces. Los preparados obtenidos se montaron utilizando líquido de montar Vecta Shield (Vecta). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse NiU E300 y confocal Nikon Eclipse TE-2000- E2. Para el análisis y edición se utilizaron los programas Adobe Photoshop CS versión 8.0.1. (Adobe Systems Incorporated), Nikon EZ-C1 FreeViewer version 3.70 (Nikon Corporation) o ImageJ [208].

Identificación de proteínas acetiladas por inmunoprecipitación y espectrometría de masa.

En la aproximación A, los parásitos se lisaron con tampón de lisis Tris HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y Tritón X-100 0,1% suplementado con inhibidores de proteasas, se sonicaron con tres pulsos de 10 segundos con potencia de 25% y se centrifugaron a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante proteico se incubó con anti-Acetil lisina (Milipore y Cell Signaling) acoplado a las esferas magnéticas (Dyna Beads, Invitrogen) a 4°C por 16 horas. Luego de varios lavados, se recuperaron las proteínas acetiladas por elución por pH ácido.

En la aproximación B, los parásitos se lisaron con tampón urea (Hepes 20 mM pH 8, Urea 8 M) y se centrifugaron a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante proteico se sometió a la digestión con Tripsina: se incubó con DTT 5 mM por 30 minutos a 37°C y luego con iodoacetamida 5 mM por 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Esto se diluyó al cuarto en Hepes 20 mM pH 8 y se agregó la Tripsina (Sigma) en una relación de 1 mg de proteasa cada 50 mg de proteína. Se terminó la digestión acidificando con trifluoroacético al 0,5%. El extracto se desaló con columnas SepPak Waters C18. El eluido se liofilizó, se resuspendió en tampón con MOPS 50 mM pH 7,2,

NaCl 50 mM y Na₃PO₄ 50 mM y se incubó con anti-Acetil Lisina agarosa (ImmuneChem) en una relación de 50 µl cada 20 mg de proteína por 16 horas a 4°C. Luego de varios lavados, los péptidos acetilados se eluyeron con trifluoroacético al 0,15%.

Los eluidos obtenidos mediante las dos aproximaciones, conteniendo proteínas o péptidos acetilados, se liofilizaron y se enviaron al laboratorio del Dr. Igor Almeida en la Universidad del Paso, Texas, para su identificación por espectrometría de masas.

Microscopía electrónica de transmisión

Los parásitos fueron fijados en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,2 con glutaraldehído 2,5% por 1 hora. Luego se lavaron con tampón cacodilato 0,1 M pH 7,2 y fueron post-fijados con tetróxido de osmio 1% conteniendo 0,8% ferrocianuro de potasio y CaCl₂ 5 mM en tampón cacodilato 0,1 M. Posteriormente se lavaron en el mismo tampón y se deshidrataron utilizando soluciones de acetona de concentración creciente y se embebieron en Epon, primero como una mezcla Epon-acetona (1:1) y después con Epon puro. Las secciones ultra finas se obtuvieron utilizando un ultramicrotomo Leica (Reichert Ultracuts). Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio de transmisión Zeiss 900. Los análisis de microscopía electrónica se realizaron en el Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidad Federal de Rio de Janeiro.

TECNICAS PARA EL TRABAJO CON ACIDOS NUCLEICOS

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl conteniendo solución de amplificación comercial suplementada con 2,5 mM MgCl₂; 0.1 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP); 20 pmoles de cebador directo y reverso, y 1U de polimerasa Taq (Invitrogen o Pegasus). Se empleó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient y la amplificación de los fragmentos se realizó en 35 ciclos de desnaturalización (50 segundos a 94°C), hibridación (50 segundos a la temperatura óptima para cada par de cebadores), extensión (72°C con el tiempo fijado a 1 minuto por 1Kpb a amplificar), seguido por un paso final de extensión durante 5 minutos.

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

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

Nombre	Secuencia	Observaciones
BDF1BamHI Fw	AAGGATCCATGACTGATTTTGTCTCTC	Sitio BamHI
BDF1XhoIHA Rv	AACTCGAGAGCATAATCCGGCACATCATACGGATAAATCTCTTCTCCTC	Sitio XhoI, epítotope de HA
BDF1XbaI Fw	AATCTAGAATGACTGATTTTGTCTCTC	Sitio XbaI
BDF1-81Xba Fw	AATCTAGAATGAATTCCTTCTACCGTGAGTG	Sitio XbaI
BDF1Sall Rv	AAGTCGACAATCTCTTCTCCTCCTC	Sitio Sall
BDF1PTS2Sall Rv	AAGTCGACGAAGGAATTCTCCAAGTG	Sitio Sall
BDF1YxA Fw	GCTACGCGGCCAATGGTGAAG	
BDF1YxA Rv	CTTCACCATTGGCCCGGTAGC	
BDF1VxA Fw	GTTTCTCCAGCGGCAGCGTTG	Utilizados para obtener los mutantes de TcBDF1
BDF1VxA Rv	CAACGCTGCCGTGGAGAAAC	
SIR2RP1BamHI Fw	AAGGATCCATGAATCAAGATAACGCCAAC	Sitio BamHI
SIR2RP1XhoI Rv	AACTCGAGAGCATAATCCGGCACATCATACGGATATTTTCGGTCTGTCCAG	Sitio XhoI, epítotope de HA
SIR2RP3BamHI Fw	AAAGGATCCATGAAGCCGCGGCTCAGAT	Sitio BamHI
SIR2RP3XhoI Rv	AACTCGAGAGCATAATCCGGCACATCATACGGATACACCGCTTGAAG	Sitio XhoI, epítotope de HA
M13 Fw	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Utilizados para verificar los clonados en el vector pCR2.1
M13 Rv	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	TOPO
ATTL1	CAACTTTGTACAAAAAGCAGGC	Utilizado para verificar los clonados en el vector pENTR3C
ATTL2	GTACAAGAAAGCTGGGTCTAG	
HX-1 Fw	CTTTTCCAACCTCTTTATGATG	Utilizado para verificar los clonados en el vector pTcINDEXGW
Ig Act Rev	CAAGGACAGAAAACGGTAAG	

Tabla X: cebadores utilizados.

Mutagénesis sitio dirigida tipo ZOE-PCR

Para la obtención de las mutantes puntuales se utilizó una estrategia de mutagénesis sitio dirigida de tipo ZOE-PCR (Figura 51). Se diseñaron los oligonucleótidos cebadores BDF1YxAFw, BDF1YxARv, BDF1VxAFw y BDF1VxARv (tabla XI), donde los codones que codifican para Y102 y V109 de TcBDF1 fueron reemplazados por codones que codifican para alanina (A).

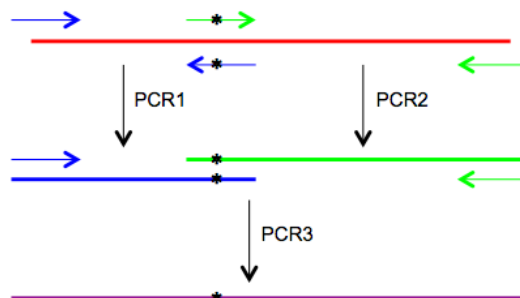


Figura 51: Esquema de la estrategia de ZOE-PCR para generar mutantes puntuales. Con asteriscos se indica el codón mutado.

Para las reacciones de PCR se utilizó como molde el plásmido pCR2.1TOPO-TcBDF1 previamente construido en el laboratorio. Se realizaron 30 ciclos de reacción, una temperatura de hibridación de 55°C, mayor concentración de dNTPs (cuatro veces el valor habitual) y la enzima Pfx ADN polimerasa (Invitrogen) (el doble de lo utilizado generalmente). Ambos fragmentos con una mutación puntual (TcBDF1Y102A-HA y TcBDF1V109A-HA) se usaron juntos como molde para la amplificación del doble mutante. Una vez obtenidos los plásmidos pCR2.1TOPO-TcBDF1Y102A-HA, pCR2.1TOPO-TcBDF1V109A-HA y pCR2.1TOPO-TcBDF1Y102A/V109A-HA, se utilizaron para la obtención de los fragmentos de interés, y su posterior clonado en el vector de entrada del sistema Gateway pENTR3C (Invitrogen) y luego en pDEST17 (Invitrogen) o pTcINDEX-GW [180]. Las secuencias codificantes para TcBDF1, TcBDF1-HA, TcBDF1Y102A/V109A-HA fueron clonadas en los vector pDEST17, para la obtención de TcBDF1 y sus variantes expresadas como fusión al epítipo de seis histidinas.

Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

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

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las muestras de ADN (ADN plasmídico, fragmentos de restricción, productos de PCR) fueron resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración (0.8% a 2%) según el tamaño de los fragmentos a separar. Se utilizó el sistema de tipo submarino [204]. La solución reguladora TAE 0,5 X se utilizó como solución de electroforesis y para la preparación de geles. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,025 % p/v azul de bromofenol, 0,025% p/v xilencianol y 30% v/v glicerol, en una proporción 5:1 en volumen de muestra: solución de siembra. Como marcadores de peso molecular se utilizaron λ -HindIII, 100 pb ladder o 1 kpb ladder (PBL). La corrida electroforética se realizó a una intensidad de corriente constante de 50 mA a 70 mA. Para el revelado se utilizó el agente intercalante Gel Green (Biotium). Luego de la electroforesis el ADN se visualizó por fluorescencia en un transiluminador de luz azul Safe Imager (Invitrogen), las imágenes se digitalizaron con una cámara Sony Cyber Shot DSC-H7 y se procesaron con Adobe Photoshop CS o ImageJ.

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

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

Purificación de ADN plasmídico de *E. coli*

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

Se determinó la concentración de ADN midiendo la absorbancia (Abs) de una alícuota a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de Abs a 260nm corresponde a 50 µg de ADN / ml de solución. La calidad de la preparación se evaluó a través del cociente (Abs260nm/Abs280nm) [204].

Secuenciación de ADN

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

Obtención de ADN total de *T. cruzi*

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

Clonado en vectores tipo T

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

Clonado por digestión con endonucleasas de restricción y ligación

A partir de los vectores tipo T conteniendo los fragmentos de interés, se obtuvieron los fragmentos de ADN codificantes digiriendo con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I. El vector de

entrada (pENTR3C) del sistema Gateway fue digerido con las mismas endonucleasas de restricción y tratado con fosfatasa alcalina intestinal (Promega), utilizando 1U de esta enzima. Ambas digestiones fueron sometidas a electroforesis en un gel de agarosa, a partir del cual se purificaron los fragmentos de ADN correspondientes al vector digerido y a los insertos a clonar. Finalmente se ligó cada fragmento de ADN con el vector digerido utilizando una relación 1:3 vector/inserto, en un volumen final de 10 μ l en el tampón específico para la enzima, con 0,5 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas). La reacción de ligación se incubó dos horas a temperatura ambiente y luego a 4°C hasta el día siguiente que se transformó en células de *E. coli* electrocompetentes. Las transformaciones se sembraron con espátulas de Drigalsky en placas de LB agar suplementadas con Kanamicina (50 μ g/ml).

Para la construcción de las fusiones a la proteína fluorescente Cherry las tres versiones de TcBDF1 se obtuvieron a partir del vector pCR2.1 TOPO digiriendo con las enzimas *Xba*I y *Sal*I. El vector pTREXmCherry [178], para expresión en *T. cruzi*, se digirió con las mismas endonucleasas de restricción y se trató con fosfatasa alcalina intestinal siguiendo el mismo protocolo de corte y ligación que para el clonado en pENTR3C.

Clonado por recombinación

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

Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

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

Transformación y selección

Se colocaron 40 μ l de la suspensión de células competentes con 1 μ l de plásmido o de mezcla de ligación en una celda de electroporación de 0,2 cm de ancho (BioRad) y se

electroporó utilizando un voltaje de 2,5 kV con un electroporador BioRad Gene Pulser XCell. Para recuperar las células se agregaron 250 µl de medio LB conteniendo 1% p/v glucosa y se incubó 1 h a 37°C. Se sembraron con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB agar suplementado con el antibiótico adecuado según la resistencia de la cepa bacteriana y del plásmido utilizado. Se suplementó además con X-Gal 40 mg/ml e IPTG 1 mM para las ligaciones en los vectores T. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 horas para seleccionar las bacterias transformantes. Después de la transformación se comprobó la presencia del plásmido introducido mediante la técnica de PCR de colonia.

Transfección de epimastigotes de *T. cruzi*

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

Los parásitos se incubaron durante 24 horas a 28°C y luego se agregó el antibiótico (Geneticina, G418 o Hygromicina) hasta concentración final 100 µg/ml para seleccionar los transfectantes. Luego de 48 horas de cultivo, se diluyó 1/5 en medio suplementado con el doble de G418 o Hygromicina, y se continuó creciendo a 28°C durante 5 días. A los 15-30 días posteriores a la transfección los parásitos del control negativo dejaron de crecer y murieron, mientras que los transfectantes se seleccionaron por su resistencia al antibiótico. Los cultivos de parásitos transfectados se subcultivaron diluyendo 1/5 cada 5 o 7 días en medio suplementado con G418 o Hygromicina para continuar el proceso de selección y mantener los cultivos. Las construcciones en pTcINDEX-GW utilizadas para transfectar fueron previamente digeridas con la enzima de restricción *SpeI*, para linealizar el vector y mejorar la eficiencia de recombinación. Además, en este caso, se transfectaron líneas previamente construídas que expresan la T7 ARN polimerasa y un gen represor de Tetraciclina a partir del plásmido episomal pLew13 [209].

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M (2000) Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 30: 35-44.
2. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, et al. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051-1054.
3. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, et al. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240-253.
4. Riganti J, Maqueda MG, Pinero MC, Volonteri VI, Galimberti RL (2012) Reactivation of Chagas' disease: cutaneous manifestations in two immunosuppressed patients. *Int J Dermatol* 51: 829-834.
5. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, et al. (2000) Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* 156: 1805-1809.
6. Valente FP, Tan CR, Temple SE, Phipps M, Witt CS, et al. (2009) The evolution and diversity of TNF block haplotypes in European, Asian and Australian Aboriginal populations. *Genes Immun* 10: 607-615.
7. Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RC (2015) Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. *Trends Parasitol*.
8. De Souza W (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 8: 269-285.
9. Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W (2012) Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1749.
10. Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB (2010) Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics* 73: 845-867.
11. Kollien AH, Schaub GA (2000) The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today* 16: 381-387.
12. Gao G, Nara T, Nakajima-Shimada J, Aoki T (1999) Novel organization and sequences of five genes encoding all six enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Mol Biol* 285: 149-161.
13. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, et al. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
14. Benabdellah K, Gonzalez-Rey E, Gonzalez A (2007) Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein. *Mol Microbiol* 65: 1559-1567.
15. Stuart K, Allen TE, Kable ML, Lawson S (1997) Kinetoplastid RNA editing: complexes and catalysts. *Curr Opin Chem Biol* 1: 340-346.

16. Blum B, Bakalara N, Simpson L (1990) A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 60: 189-198.
17. Opperdoes FR (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 41: 127-151.
18. Cunha-e-Silva N, Sant'Anna C, Pereira MG, Porto-Carreiro I, Jeovanio AL, et al. (2006) Reservosomes: multipurpose organelles? *Parasitol Res* 99: 325-327.
19. Campbell DA, Thomas S, Sturm NR (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* 5: 1231-1240.
20. Clayton CE (1999) Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol Today* 15: 372-378.
21. Sutton RE, Boothroyd JC (1986) Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell* 47: 527-535.
22. Agabian N (1990) Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61: 1157-1160.
23. Tielens AG, van Hellemond JJ (2009) Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends Parasitol* 25: 482-490.
24. Opperdoes FR, Michels PA (2001) Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *Int J Parasitol* 31: 482-490.
25. Cazzulo JJ (1992) Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem* 18: 235-257.
26. Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F, Stern S, Olafson RW, et al. (2008) Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* 22: 590-602.
27. Cazzulo JJ AS, Franke de Cazzulo B.M., Cannata J.J.B. (1988) On the production of glicerol and L-alanine during the aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FEMS Microbiol Lett* 51: 187-192.
28. Cannata JJ, Cazzulo JJ (1984) The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B* 79: 297-308.
29. Mancilla R, Naquira C (1964) Comparative Metabolism of C14-Glucose in Two Strains of *Trypanosoma Cruzi*. *J Protozool* 11: 509-513.
30. Frydman B, de los Santos C, Cannata JJ, Cazzulo JJ (1990) Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [1-13C]glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Evidence of the presence of two alanine pools and of two CO2 fixation reactions. *Eur J Biochem* 192: 363-368.
31. Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1463-1477.
32. Darling TN, Balber AE, Blum JJ (1988) A comparative study of D-lactate, L-lactate and glycerol formation by four species of *Leishmania* and by *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma brucei gambiense*. *Mol Biochem Parasitol* 30: 253-257.
33. Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, et al. (1984) Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 98: 1178-1184.
34. Coombs GH, Tetley L, Moss VA, Vickerman K (1986) Three dimensional structure of the *Leishmania* amastigote as revealed by computer-aided reconstruction from serial sections. *Parasitology* 92 (Pt 1): 13-23.

35. Moyersoen J, Choe J, Fan E, Hol WG, Michels PA (2004) Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiol Rev* 28: 603-643.
36. de Souza W (2008) An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des* 14: 822-838.
37. Bringaud F, Riviere L, Coustou V (2006) Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 149: 1-9.
38. Naderer T, Ellis MA, Sernee MF, De Souza DP, Curtis J, et al. (2006) Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5502-5507.
39. Haanstra JR, van Tuijl A, Kessler P, Reijnders W, Michels PA, et al. (2008) Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17718-17723.
40. Haanstra JR, Bakker BM, Michels PA (2014) In or out? On the tightness of glycosomal compartmentalization of metabolites and enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 198: 18-28.
41. Haanstra JR, Gonzalez-Marcano EB, Gualdron-Lopez M, Michels PA (2015) Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. *Biochim Biophys Acta*.
42. Schnell DJ, Hebert DN (2003) Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* 112: 491-505.
43. Hausler T, Stierhof YD, Wirtz E, Clayton C (1996) Import of a DHFR hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the folate-analogue aminopterin. *J Cell Biol* 132: 311-324.
44. Reumann S (2004) Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiol* 135: 783-800.
45. Lametschwandtner G, Brocard C, Fransen M, Van Veldhoven P, Berger J, et al. (1998) The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J Biol Chem* 273: 33635-33643.
46. Blattner J, Swinkels B, Dorsam H, Prospero T, Subramani S, et al. (1992) Glycosome assembly in trypanosomes: variations in the acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. *J Cell Biol* 119: 1129-1136.
47. Opperdoes FR, Szikora JP (2006) In silico prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 147: 193-206.
48. Galland N, de Walque S, Voncken FG, Verlinde CL, Michels PA (2010) An internal sequence targets *Trypanosoma brucei* triosephosphate isomerase to glycosomes. *Mol Biochem Parasitol* 171: 45-49.
49. Parsons M, Furuya T, Pal S, Kessler P (2001) Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol* 115: 19-28.
50. Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* 20: 257-259.

51. Stanley WA, Filipp FV, Kursula P, Schuller N, Erdmann R, et al. (2006) Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p. *Mol Cell* 24: 653-663.
52. Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 24: 181-185.
53. Dodt G, Warren D, Becker E, Rehling P, Gould SJ (2001) Domain mapping of human PEX5 reveals functional and structural similarities to *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p and Pex21p. *J Biol Chem* 276: 41769-41781.
54. Leon S, Zhang L, McDonald WH, Yates J, 3rd, Cregg JM, et al. (2006) Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p: ubiquitin-dependent localization and regulation. *J Cell Biol* 172: 67-78.
55. Woodward AW, Bartel B (2005) The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Mol Biol Cell* 16: 573-583.
56. Grunau S, Schliebs W, Linnepe R, Neufeld C, Cizmowski C, et al. (2009) Peroxisomal targeting of PTS2 pre-import complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 10: 451-460.
57. Brown LA, Baker A (2008) Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (review). *Mol Membr Biol* 25: 363-375.
58. Erdmann R, Blobel G (1996) Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *J Cell Biol* 135: 111-121.
59. Stein K, Schell-Steven A, Erdmann R, Rottensteiner H (2002) Interactions of Pex7p and Pex18p/Pex21p with the peroxisomal docking machinery: implications for the first steps in PTS2 protein import. *Mol Cell Biol* 22: 6056-6069.
60. Albertini M, Rehling P, Erdmann R, Girzalsky W, Kiel JA, et al. (1997) Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell* 89: 83-92.
61. Rucktaschel R, Girzalsky W, Erdmann R (2011) Protein import machineries of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* 1808: 892-900.
62. de Walque S, Kiel JA, Veenhuis M, Opperdoes FR, Michels PA (1999) Cloning and analysis of the PTS-1 receptor in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 104: 106-119.
63. Moyersoen J, Choe J, Kumar A, Voncken FG, Hol WG, et al. (2003) Characterization of *Trypanosoma brucei* PEX14 and its role in the import of glycosomal matrix proteins. *Eur J Biochem* 270: 2059-2067.
64. Galland N, Demeure F, Hannaert V, Verplaetse E, Vertommen D, et al. (2007) Characterization of the role of the receptors PEX5 and PEX7 in the import of proteins into glycosomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta* 1773: 521-535.
65. Vidali G, Gershey EL, Allfrey VG (1968) Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones. *J Biol Chem* 243: 6361-6366.
66. Gu W, Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90: 595-606.
67. Polevoda B, Sherman F (2002) The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol* 3: reviews0006.

68. Yang XJ (2004) Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* 26: 1076-1087.
69. Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
70. Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 19: 1176-1179.
71. de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA (2005) Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27: 164-175.
72. Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
73. Norris KL, Lee JY, Yao TP (2009) Acetylation goes global: the emergence of acetylation biology. *Sci Signal* 2: pe76.
74. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, et al. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325: 834-840.
75. Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, et al. (2006) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell* 23: 607-618.
76. Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, et al. (2010) Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327: 1000-1004.
77. Yu BJ, Kim JA, Moon JH, Ryu SE, Pan JG (2008) The diversity of lysine-acetylated proteins in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1529-1536.
78. Zhang J, Sprung R, Pei J, Tan X, Kim S, et al. (2009) Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics* 8: 215-225.
79. Wang Q, Zhang Y, Yang C, Xiong H, Lin Y, et al. (2010) Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science* 327: 1004-1007.
80. Weinert BT, Wagner SA, Horn H, Henriksen P, Liu WR, et al. (2011) Proteome-wide mapping of the *Drosophila* acetylome demonstrates a high degree of conservation of lysine acetylation. *Sci Signal* 4: ra48.
81. Finkemeier I, Laxa M, Miguet L, Howden AJ, Sweetlove LJ (2011) Proteins of diverse function and subcellular location are lysine acetylated in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155: 1779-1790.
82. Henriksen P, Wagner SA, Weinert BT, Sharma S, Bacinskaja G, et al. (2012) Proteome-wide analysis of lysine acetylation suggests its broad regulatory scope in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 11: 1510-1522.
83. Jeffers V, Sullivan WJ, Jr. (2012) Lysine acetylation is widespread on proteins of diverse function and localization in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* 11: 735-742.
84. Lundby A, Lage K, Weinert BT, Bekker-Jensen DB, Secher A, et al. (2012) Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Rep* 2: 419-431.
85. Melo-Braga MN, Verano-Braga T, Leon IR, Antonacci D, Nogueira FC, et al. (2012) Modulation of protein phosphorylation, N-glycosylation and Lys-acetylation in grape (*Vitis vinifera*) mesocarp and exocarp owing to *Lobesia botrana* infection. *Mol Cell Proteomics* 11: 945-956.

86. Miao J, Lawrence M, Jeffers V, Zhao F, Parker D, et al. (2013) Extensive lysine acetylation occurs in evolutionarily conserved metabolic pathways and parasite-specific functions during *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic development. *Mol Microbiol* 89: 660-675.
87. Okanishi H, Kim K, Masui R, Kuramitsu S (2013) Acetylome with structural mapping reveals the significance of lysine acetylation in *Thermus thermophilus*. *J Proteome Res* 12: 3952-3968.
88. Wu X, Vellaichamy A, Wang D, Zamdborg L, Kelleher NL, et al. (2013) Differential lysine acetylation profiles of *Erwinia amylovora* strains revealed by proteomics. *J Proteomics* 79: 60-71.
89. Lee DW, Kim D, Lee YJ, Kim JA, Choi JY, et al. (2013) Proteomic analysis of acetylation in thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Proteomics* 13: 2278-2282.
90. Smith-Hammond CL, Swatek KN, Johnston ML, Thelen JJ, Miernyk JA (2014) Initial description of the developing soybean seed protein Lys-N(epsilon)-acetylome. *J Proteomics* 96: 56-66.
91. Smith-Hammond CL, Hoyos E, Miernyk JA (2014) The pea seedling mitochondrial Nepsilon-lysine acetylome. *Mitochondrion* 19 Pt B: 154-165.
92. Pan J, Ye Z, Cheng Z, Peng X, Wen L, et al. (2014) Systematic analysis of the lysine acetylome in *Vibrio parahemolyticus*. *J Proteome Res* 13: 3294-3302.
93. Liu F, Yang M, Wang X, Yang S, Gu J, et al. (2014) Acetylome analysis reveals diverse functions of lysine acetylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell Proteomics* 13: 3352-3366.
94. Mo R, Yang M, Chen Z, Cheng Z, Yi X, et al. (2015) Acetylome analysis reveals the involvement of lysine acetylation in photosynthesis and carbon metabolism in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Proteome Res* 14: 1275-1286.
95. Nie Z, Zhu H, Zhou Y, Wu C, Liu Y, et al. (2015) Comprehensive profiling of lysine acetylation suggests the widespread function is regulated by protein acetylation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proteomics* 15: 3253-3266.
96. Hammond JW, Cai D, Verhey KJ (2008) Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 20: 71-76.
97. Verhey KJ, Gaertig J (2007) The tubulin code. *Cell Cycle* 6: 2152-2160.
98. Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391: 199-203.
99. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, Gillard M, Close P, et al. (2009) Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 136: 551-564.
100. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, et al. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417: 455-458.
101. Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, et al. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J* 22: 1168-1179.
102. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11: 437-444.

103. Jiang W, Wang S, Xiao M, Lin Y, Zhou L, et al. (2011) Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Mol Cell* 43: 33-44.
104. Friedmann DR, Marmorstein R (2013) Structure and mechanism of non-histone protein acetyltransferase enzymes. *FEBS J* 280: 5570-5581.
105. Mujtaba S, Zeng L, Zhou MM (2007) Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26: 5521-5527.
106. Marmorstein R, Roth SY (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* 11: 155-161.
107. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, et al. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-442.
108. Ochaya S, Respuela P, Simonsson M, Saraswathi A, Branche C, et al. (2007) Characterization of a *Trypanosoma cruzi* acetyltransferase: cellular location, activity and structure. *Mol Biochem Parasitol* 152: 123-131.
109. Kawahara T, Siegel TN, Ingram AK, Alsford S, Cross GA, et al. (2008) Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. *Mol Microbiol* 69: 1054-1068.
110. Kumar D, Rajanala K, Minocha N, Saha S (2012) Histone H4 lysine 14 acetylation in *Leishmania donovani* is mediated by the MYST-family protein HAT4. *Microbiology* 158: 328-337.
111. Huang B, Johansson MJ, Bystrom AS (2005) An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA* 11: 424-436.
112. Barton D, Braet F, Marc J, Overall R, Gardiner J (2009) ELP3 localises to mitochondria and actin-rich domains at edges of HeLa cells. *Neurosci Lett* 455: 60-64.
113. Rahl PB, Chen CZ, Collins RN (2005) Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation. *Mol Cell* 17: 841-853.
114. Yang XJ, Seto E (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 206-218.
115. Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, et al. (1995) The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* 9: 2888-2902.
116. Haigis MC, Guarente LP (2006) Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20: 2913-2921.
117. Rusche LN, Kirchmaier AL, Rine J (2003) The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 72: 481-516.
118. Blander G, Guarente L (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73: 417-435.
119. Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, Denu JM (2000) Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14178-14182.

120. Frye RA (1999) Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 273-279.
121. Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q (2005) SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 280: 13560-13567.
122. Westphal CH, Dipp MA, Guarente L (2007) A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends Biochem Sci* 32: 555-560.
123. Borra MT, Langer MR, Slama JT, Denu JM (2004) Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *Biochemistry* 43: 9877-9887.
124. Sauve AA (2010) Sirtuin chemical mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1804: 1591-1603.
125. Hoff KG, Avalos JL, Sens K, Wolberger C (2006) Insights into the sirtuin mechanism from ternary complexes containing NAD⁺ and acetylated peptide. *Structure* 14: 1231-1240.
126. Yuan H, Marmorstein R (2012) Structural basis for sirtuin activity and inhibition. *J Biol Chem* 287: 42428-42435.
127. Accili D, de Cabo R, Sinclair DA (2011) An unSIRTain role in longevity. *Nat Med* 17: 1350-1351.
128. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13: 2570-2580.
129. Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410: 227-230.
130. Bauer JH, Morris SN, Chang C, Flatt T, Wood JG, et al. (2009) dSir2 and Dmp53 interact to mediate aspects of CR-dependent lifespan extension in *D. melanogaster*. *Aging (Albany NY)* 1: 38-48.
131. Guarente L (2011) Sirtuins, aging, and metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76: 81-90.
132. Haigis MC, Sinclair DA (2010) Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5: 253-295.
133. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 225-238.
134. Schug TT, Xu Q, Gao H, Peres-da-Silva A, Draper DW, et al. (2010) Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. *Mol Cell Biol* 30: 4712-4721.
135. Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, Babendure JL, Sonoda N, et al. (2010) SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E419-428.
136. Ingram AK, Horn D (2002) Histone deacetylases in *Trypanosoma brucei*: two are essential and another is required for normal cell cycle progression. *Mol Microbiol* 45: 89-97.
137. Wang QP, Kawahara T, Horn D (2010) Histone deacetylases play distinct roles in telomeric VSG expression site silencing in African trypanosomes. *Mol Microbiol* 77: 1237-1245.

138. Alsford S, Kawahara T, Isamah C, Horn D (2007) A sirtuin in the African trypanosome is involved in both DNA repair and telomeric gene silencing but is not required for antigenic variation. *Mol Microbiol* 63: 724-736.
139. Vergnes B, Sereno D, Tavares J, Cordeiro-da-Silva A, Vanhille L, et al. (2005) Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in *Leishmania* survival and proliferation. *Gene* 363: 85-96.
140. Tavares J, Ouaiissi A, Santarem N, Sereno D, Vergnes B, et al. (2008) The *Leishmania infantum* cytosolic SIR2-related protein 1 (LiSIR2RP1) is an NAD⁺-dependent deacetylase and ADP-ribosyltransferase. *Biochem J* 415: 377-386.
141. Fessel MR, Lira CB, Giorgio S, Ramos CH, Cano MI (2011) Sir2-Related Protein 1 from *Leishmania amazonensis* is a glycosylated NAD⁺-dependent deacetylase. *Parasitology* 138: 1245-1258.
142. Zemzoumi K, Sereno D, Francois C, Guilvard E, Lemesre JL, et al. (1998) *Leishmania major*: cell type dependent distribution of a 43 kDa antigen related to silent information regulatory-2 protein family. *Biol Cell* 90: 239-245.
143. Garcia-Salcedo JA, Gijon P, Nolan DP, Tebabi P, Pays E (2003) A chromosomal SIR2 homologue with both histone NAD-dependent ADP-ribosyltransferase and deacetylase activities is involved in DNA repair in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 22: 5851-5862.
144. Kowieski TM, Lee S, Denu JM (2008) Acetylation-dependent ADP-ribosylation by *Trypanosoma brucei* Sir2. *J Biol Chem* 283: 5317-5326.
145. Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE (2009) Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 280: 125-133.
146. Kelly JM, Taylor MC, Horn D, Loza E, Kalvinsh I, et al. (2012) Inhibitors of human histone deacetylase with potent activity against the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 1886-1890.
147. Guerrant W, Mwakwari SC, Chen PC, Khan SI, Tekwani BL, et al. (2010) A structure-activity relationship study of the antimalarial and antileishmanial activities of nonpeptide macrocyclic histone deacetylase inhibitors. *ChemMedChem* 5: 1232-1235.
148. Andrews KT, Tran TN, Wheatley NC, Fairlie DP (2009) Targeting histone deacetylase inhibitors for anti-malarial therapy. *Curr Top Med Chem* 9: 292-308.
149. Vanagas L, Jeffers V, Bogado SS, Dalmasso MC, Sullivan WJ, Jr., et al. (2012) *Toxoplasma* histone acetylation remodelers as novel drug targets. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10: 1189-1201.
150. Heltweg B, Gatbonton T, Schuler AD, Posakony J, Li H, et al. (2006) Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res* 66: 4368-4377.
151. Gertz M, Fischer F, Nguyen GT, Lakshminarasimhan M, Schutkowski M, et al. (2013) Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2772-2781.
152. Sereno D, Alegre AM, Silvestre R, Vergnes B, Ouaiissi A (2005) In vitro antileishmanial activity of nicotinamide. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 808-812.
153. Soares MB, Silva CV, Bastos TM, Guimaraes ET, Figueira CP, et al. (2012) Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of nicotinamide. *Acta Trop* 122: 224-229.

154. Kaur S, Shivange AV, Roy N (2010) Structural analysis of trypanosomal sirtuin: an insight for selective drug design. *Mol Divers* 14: 169-178.
155. Sacconay L, Smirlis D, Queiroz EF, Wolfender JL, Soares MB, et al. (2013) Structural insights of SIR2rp3 proteins as promising biotargets to fight against Chagas disease and leishmaniasis. *Mol Biosyst* 9: 2223-2230.
156. Sacconay L, Angleviel M, Randazzo GM, Queiroz MM, Queiroz EF, et al. (2014) Computational studies on sirtuins from *Trypanosoma cruzi*: structures, conformations and interactions with phytochemicals. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2689.
157. Zeng L, Zhou MM (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513: 124-128.
158. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, et al. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399: 491-496.
159. Zeng L, Zhang Q, Gerona-Navarro G, Moshkina N, Zhou MM (2008) Structural basis of site-specific histone recognition by the bromodomains of human coactivators PCAF and CBP/p300. *Structure* 16: 643-652.
160. Sanchez R, Zhou MM (2009) The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12: 659-665.
161. Umehara T, Nakamura Y, Jang MK, Nakano K, Tanaka A, et al. (2010) Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain. *J Biol Chem* 285: 7610-7618.
162. Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, Keates T, Lambert JP, et al. (2012) Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* 149: 214-231.
163. Owen DJ, Ornaghi P, Yang JC, Lowe N, Evans PR, et al. (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* 19: 6141-6149.
164. Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, et al. (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111: 369-379.
165. Zeng L, Li J, Muller M, Yan S, Mujtaba S, et al. (2005) Selective small molecules blocking HIV-1 Tat and coactivator PCAF association. *J Am Chem Soc* 127: 2376-2377.
166. Sachchidanand, Resnick-Silverman L, Yan S, Mutjaba S, Liu WJ, et al. (2006) Target structure-based discovery of small molecules that block human p53 and CREB binding protein association. *Chem Biol* 13: 81-90.
167. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, et al. (2010) Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468: 1067-1073.
168. Nicodeme E, Jeffrey KL, Schaefer U, Beinke S, Dewell S, et al. (2010) Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468: 1119-1123.
169. Meslamani J, Smith SG, Sanchez R, Zhou MM (2014) ChEpiMod: a knowledgebase for chemical modulators of epigenome reader domains. *Bioinformatics* 30: 1481-1483.
170. Sanchez R, Meslamani J, Zhou MM (2014) The bromodomain: from epigenome reader to druggable target. *Biochim Biophys Acta* 1839: 676-685.

171. Seal J, Lamotte Y, Donche F, Bouillot A, Mirguet O, et al. (2012) Identification of a novel series of BET family bromodomain inhibitors: binding mode and profile of I-BET151 (GSK1210151A). *Bioorg Med Chem Lett* 22: 2968-2972.
172. Chung CW, Coste H, White JH, Mirguet O, Wilde J, et al. (2011) Discovery and characterization of small molecule inhibitors of the BET family bromodomains. *J Med Chem* 54: 3827-3838.
173. Bamborough P, Diallo H, Goodacre JD, Gordon L, Lewis A, et al. (2012) Fragment-based discovery of bromodomain inhibitors part 2: optimization of phenylisoxazole sulfonamides. *J Med Chem* 55: 587-596.
174. Villanova GV, Nardelli SC, Cribb P, Magdaleno A, Silber AM, et al. (2009) *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2 (BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation. *Int J Parasitol* 39: 665-673.
175. Alonso VL, Villanova GV, Ritagliati C, Machado Motta MC, Cribb P, et al. (2014) *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 3 binds acetylated alpha-tubulin and concentrates in the flagellum during metacyclogenesis. *Eukaryot Cell* 13: 822-831.
176. Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5: 725-738.
177. Milagros Camara Mde L, Bouvier LA, Miranda MR, Pereira CA (2012) Identification and validation of *Trypanosoma cruzi*'s glycosomal adenylate kinase containing a peroxisomal targeting signal. *Exp Parasitol* 130: 408-411.
178. Bouvier LA, Camara Mde L, Canepa GE, Miranda MR, Pereira CA (2013) Plasmid vectors and molecular building blocks for the development of genetic manipulation tools for *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 8: e80217.
179. Blattner J, Dorsam H, Clatyon CE (1995) Function of N-terminal import signals in trypanosome microbodies. *FEBS Lett* 360: 310-314.
180. Alonso VL, Ritagliati C, Cribb P, Serra EC (2014) Construction of three new Gateway(R) expression plasmids for *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 1081-1085.
181. Elias MC, da Cunha JP, de Faria FP, Mortara RA, Freymuller E, et al. (2007) Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist* 158: 147-157.
182. Crowley T, Brunori M, Rhee K, Wang X, Wolgemuth DJ (2004) Change in nuclear-cytoplasmic localization of a double-bromodomain protein during proliferation and differentiation of mouse spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res Dev Brain Res* 149: 93-101.
183. Crowley TE, Kaine EM, Yoshida M, Nandi A, Wolgemuth DJ (2002) Reproductive cycle regulation of nuclear import, euchromatic localization, and association with components of Pol II mediator of a mammalian double-bromodomain protein. *Mol Endocrinol* 16: 1727-1737.
184. Trousdale RK, Wolgemuth DJ (2004) Bromodomain containing 2 (Brd2) is expressed in distinct patterns during ovarian folliculogenesis independent of FSH or GDF9 action. *Mol Reprod Dev* 68: 261-268.
185. Szoor B, Haanstra JR, Gualdron-Lopez M, Michels PA (2014) Evolution, dynamics and specialized functions of glycosomes in metabolism and development of trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol* 22: 79-87.

186. Chang JH, Kim HC, Hwang KY, Lee JW, Jackson SP, et al. (2002) Structural basis for the NAD-dependent deacetylase mechanism of Sir2. *J Biol Chem* 277: 34489-34498.
187. Greiss S, Gartner A (2009) Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Mol Cells* 28: 407-415.
188. Souto-Padron T, Cunha e Silva NL, de Souza W (1993) Acetylated alpha-tubulin in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 517-528.
189. Zheng W, Lu YB, Liang ST, Zhang QJ, Xu J, et al. (2013) SIRT1 mediates the protective function of Nkx2.5 during stress in cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 108: 364.
190. Moreira DR, Leite AC, dos Santos RR, Soares MB (2009) Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Curr Drug Targets* 10: 212-231.
191. Lugin J, Ciarlo E, Santos A, Grandmaison G, dos Santos I, et al. (2013) The sirtuin inhibitor cambinol impairs MAPK signaling, inhibits inflammatory and innate immune responses and protects from septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1498-1510.
192. Chakrabarty SP, Ramapanicker R, Mishra R, Chandrasekaran S, Balaram H (2009) Development and characterization of lysine based tripeptide analogues as inhibitors of Sir2 activity. *Bioorg Med Chem* 17: 8060-8072.
193. Maurer B, Rumpf T, Scharfe M, Stolfa DA, Schmitt ML, et al. (2012) Inhibitors of the NAD(+)-Dependent Protein Desuccinylase and Demalonylase Sirt5. *ACS Med Chem Lett* 3: 1050-1053.
194. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, et al. (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126: 941-954.
195. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, et al. (2007) Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 27: 8807-8814.
196. Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, Kachholz B, Becker CF, et al. (2008) Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol* 382: 790-801.
197. Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ (2000) Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol* 86: 1213-1218.
198. Wainszelbaum MJ, Belaunzaran ML, Lammel EM, Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, et al. (2003) Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 375: 705-712.
199. Sereno D, Vanhille L, Vergnes B, Monte-Allegre A, Ouaisi A (2005) Experimental study of the function of the excreted/secreted *Leishmania* LmSIR2 protein by heterologous expression in eukaryotic cell line. *Kinetoplastid Biol Dis* 4: 1.
200. Kadam RU, Tavares J, Kiran VM, Cordeiro A, Ouaisi A, et al. (2008) Structure function analysis of *Leishmania* sirtuin: an ensemble of in silico and biochemical studies. *Chem Biol Drug Des* 71: 501-506.
201. Zheng W (2013) Mechanism-based modulator discovery for sirtuin-catalyzed deacetylation reaction. *Mini Rev Med Chem* 13: 132-154.

202. Prusty D, Mehra P, Srivastava S, Shivange AV, Gupta A, et al. (2008) Nicotinamide inhibits Plasmodium falciparum Sir2 activity in vitro and parasite growth. FEMS Microbiol Lett 282: 266-272.
203. Ginger ML, McFadden GI, Michels PA (2010) The evolution of organellar metabolism in unicellular eukaryotes. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 365: 693-698.
204. Sambrook J, Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory Press 1.
205. Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, et al. (1988) Biological aspects of the Dm 28c clone of Trypanosoma cruzi after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz 83: 123-133.
206. Grisard EC, Teixeira SM, de Almeida LG, Stoco PH, Gerber AL, et al. (2014) Trypanosoma cruzi Clone Dm28c Draft Genome Sequence. Genome Announc 2.
207. Hendriksen CF (2005) Introduction: laboratory animals and immunization procedures: challenges and opportunities. ILAR J 46: 227-229.
208. Collins TJ (2007) ImageJ for microscopy. Biotechniques 43: 25-30.
209. Taylor MC, Kelly JM (2006) pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for Trypanosoma cruzi. BMC Biotechnol 6: 32.

ANEXO

TriTryp ID	Descripción	Gene Bank ID	PM	Localización	Proceso biológico	Exp.
Biología de la cromatina						
TcCLB.511323.40	Histona H2A	gi 72391930	19 kDa	Núcleo	Organización de la cromatina y de los cromosomas, ensamblado de nucleosomas	A
TcCLB.506779.150	Histona H2B variante	gi 71653830	16 kDa	Núcleo	Organización de la cromatina y de los cromosomas, ensamblado de nucleosomas	A
TcCLB.511635.10	Histona H2B	gi 205278866 (+8)	12 kDa	Núcleo	Ensamblado de nucleosomas	B
Procesamiento ADN/ARN						
TcCLB.508319.40	ARN helicasa	gi 71411514	49 kDa	Citosol	Procesamiento ARN	AB
TcCLB.508141.40	ARN helicasa ATP-dependiente	gi 407852405 (+2)	131 kDa	Citosol	Procesamiento ARN	B
TcCLB.508461.140	Proteína de unión a poly(A)	gi 340056333 (+3)	61 kDa		Procesamiento ARN	B
TcCLB.507221.80	5'-3' exonucleasa XRNC, putativa	gi 342182575	64 kDa	Núcleo	Procesamiento ARN	B
TcCLB.509791.120	Proteína asociada al kinetoplasto (KAP6)	gi 71654654	21 kDa	Mitocondria	Empaquetamiento de ADN	A
TcCLB.507927.20	Proteína de unión a oligo_U TBRGG1	gi 71414902	97 kDa	Mitocondria	Biosíntesis ARN	A
Traducción y biogénesis de ribosomas						
TcCLB.510999.39	40S proteína ribosomal S3a	gi 71665348	30 kDa	Ribosoma	Traducción	AB
TcCLB.507251.20	60S proteína ribosomal L21E	gi 71403133 (+4)	18 kDa	Ribosoma	Traducción	A
TcCLB.506297.150	40S proteína ribosomal S5	gi 70834090	21 kDa	Ribosoma	Traducción	AB
TcCLB.507513.60	40S proteína ribosomal S16	gi 71424421	17 kDa	Ribosoma	Traducción	A
TcCLB.510243.40	60S proteína ribosomal L10	gi 71422972	25 kDa	Ribosoma	Traducción	A
TcCLB.503833.40	40S proteína ribosomal S2	gi 342184985 (+5)	29 kDa	Ribosoma	Traducción	B
TcCLB.508207.110	60S proteína ribosomal L7	gi 71662832	28 kDa	Ribosoma	Biogénesis de ribosomas	A
TcCLB.508175.309	60S proteína ribosomal L19	gi 12407954 (+7)	38 kDa	Ribosoma	Traducción, biogénesis de ribosomas	B
TcCLB.506593.30	Proteína ribosomal S7	gi 407851711 (+2)	26 kDa	Ribosoma	Traducción	B
TcCLB.504121.30	60S proteína ribosomal L4	gi 407410738 (+4)	44 kDa	Ribosoma	Traducción	B
TcCLB.506241.170	40S proteína ribosomal S6	gi 407862967 (+1)	28 kDa	Ribosoma	Traducción, regulación del crecimiento celular	B
TcCLB.505977.26	Proteína ribosomal tipo P2	gi 10634 (+1)	11 kDa	Ribosoma	Traducción, elongación	B
TcCLB.506925.120	Factor iniciador eucariótico 5a	gi 71659671	18 kDa	Citosol	Iniciación de la traducción	B
TcCLB.506459.290	Factor de elongación 1-gamma (EF-1-gamma)	gi 430384527 (+1)	47 kDa	Núcleo/Cito	Elongación de la traducción	B
					Elongación de la traducción, procesos asociados al microtúbulo, señalización mediada por calcio	
TcCLB.511367.370	Factor de elongación 1 alfa	gi 205278886 (+7)	49 kDa	Citosol		B
TcCLB.510963.90	Factor de elongación 2	gi 70832371	94 kDa	Citosol	Traducción	B
TcCLB.506679.70	Factor iniciador de la traducción eucariótico (eIF-6)	gi 313118266 (+4)	27 kDa	Ribosoma	Ensamblado de ribosomas maduros	B
TcCLB.511181.80	Sintetasa treonil-ARNt	gi 71655606	93 kDa	Citosol	Traducción, ARNt aminoacilación	B
					Ensamblado de complejos proteicos, asparaginil-ARNt aminoacilación	
TcCLB.509039.4	Sintetasa aspartil-ARNt	gi 71406177	14 kDa	Citosol		B
TcCLB.509247.50	Sintetasa metionil-ARNt	gi 407842268	86 kDa	Citosol	Metionil-ARNt aminoacilación	B
TcCLB.506207.50	Proteína tumoral controlada por la traducción (TCTP)	gi 71407834	20 kDa	Cito/Mito	Traducción	B
TcCLB.510579.70	Subunidad del complejo asociado al polipéptido naciente	gi 71419111 (+1)	20 kDa	Citosol	Traducción, Plegamiento proteico co-traducciona	B
Citoesqueleto & tráfico vesicular						
					Organización citoesqueleto/microtúbulos, proceso catabólico de GTP movimiento de componentes celulares; polimerización proteica	
TcCLB.411235.9	Tubulina alfa	gi 1314208 (+2)	47 kDa	Microtúbulos		B
					Organización citoesqueleto/microtúbulos, proceso catabólico de GTP movimiento de componentes celulares; polimerización proteica	
TcCLB.506563.40	Tubulina beta 2.3	gi 18568141	50 kDa	Microtúbulos		B
					Organización citoesqueleto/microtúbulos, proceso catabólico de GTP movimiento de componentes celulares; polimerización proteica	
TcCLB.411235.9	Tubulina epsilon, putativa	gi 407398727	28 kDa	Microtúbulos		B
					Movimiento de componentes celulares, locomoción	
TcCLB.509617.20	Proteína 3 de la barra paraflagelar, putativa	gi 407410649 (+2)	69 kDa	Microtúbulos		B
					Movimiento de componentes celulares, locomoción	
TcCLB.511215.119	69 kDa proteína de la barra paraflagelar, putativa	gi 162179 (+4)	70 kDa	Microtúbulos		B
TcCLB.507891.47	Proteína flagelar de unión a calcio, putativa	gi 314159747	24 kDa	Microtúbulos	Movilidad flagelar, transporte de ión calcio	B
TcCLB.508323.60	Centrina, putative	gi 71655858	17 kDa	Microtúbulos		B
TcCLB.508323.100	I/6 autoantígeno, putativa	gi 407426011 (+3)	23 kDa	Microtúbulos		B
TcCLB.506391.10	Calmodulina (CALA2)	gi 261335335	17 kDa	Flagelo		B
TcCLB.506167.50	Clatrina cadena pesada	gi 71415421	193 kDa	Vesícula	Transporte vesicular	AB

Transportadores						
TcCLB.506249.70	Transportador ABC	gi 71408534	75 kDa	Membrana	Transporte	A
TcCLB.510773.20	Translocador de protones pirofosfatasa 1 tipo vacuol	gi 71652422	85 kDa	Membrana	Transporte de protones	A
TcCLB.505763.19	H+-ATPasa tipo P	gi 19401140	101 kDa	Membrana	Proceso catabólico de ATP, procesos metabólicos, transporte de protones	A
TcCLB.506025.50	Subunidad B ATP sintasa tipo vacuolar	gi 407419769 (+3)	56 kDa	Vacuola/liso	Transporte de protones, procesos metabólicos de ATP, hidrólisis de ATP acoplada al transporte de protones	B
TcCLB.511289.70	Proteína 1 transportadora de ADP y ATP	gi 71664966	35 kDa	Mitocondria	Transporte	AB
TcCLB.508741.229	Canal selectivo de aniones dependiente de voltaje	gi 407864554 (+6)	30 kDa	Mitocondria	Transporte de iones	B
TcCLB.509733.170	ATPasa temporaria del reticulo endoplasmico	gi 407409792 (+2)	95 kDa	RE/membrana		B
Proteína kinasas/fosfatasa						
TcCLB.506297.190	Piruvato fosfato dikinasa 1	gi 10119899 (+1)	101 kDa	Glicosoma	Fosforilación	B
TcCLB.507241.30	Arginina kinasa	gi 3831705 (+3)	40 kDa	Citosol	Fosforilación	B
TcCLB.509607.70	Serina/treonina proteína kinasa	gi 407398250 (+3)	34 kDa		Fosforilación	B
Respuesta al estrés, chaperonas, degradación de proteínas						
TcCLB.511465.10	Proteína activadora de proteosoma pa26	gi 407848921 (+3)	26 kDa	Citosol	Proteólisis	B
TcCLB.510729.70	20S proteosoma subunidad alfa	gi 11066267	27 kDa	Citosol	Proteólisis, catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina	B
TcCLB.506859.20	Subunidad ATPasa reguladora de proteosoma	gi 340054604 (+7)	50 kDa	Citosol	Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina	B
TcCLB.511181.50	Peptidasa de procesamiento mitocondrial, subunida	gi 71655600	54 kDa	Mitocondria	Proteólisis	AB
TcCLB.506295.130	Prohibitina, putativa	gi 70832347	32 kDa	Mitocondria	Proteólisis	A
TcCLB.511441.10	Calpain cisteína peptidasa	gi 71404593	145 kDa	Citosol	Proteólisis	B
TcCLB.509695.210	Serina carboxipeptidasa III	gi 342183847	52 kDa	Citosol	Proteólisis	B
TcCLB.510535.100	Cisteína peptidasa C (CPC)	gi 71424150	37 kDa	Lisosoma	Proteólisis, regulación de actividad catalítica	B
TcCLB.504045.60	Carboxipeptidasa termoestable 1	gi 71419295	58 kDa	Citosol	Proteólisis, metabolismo de péptidos	B
TcCLB.507689.30	Glutamamil carboxipeptidasa,clan MH,familia M18	gi 71410070	44 kDa	Citosol	Proteólisis, biosíntesis de arginina	B
TcCLB.510837.20	Glutamamil carboxipeptidasa	gi 71403542	44 kDa	Citosol	Proteólisis, biosíntesis de arginina	B
TcCLB.508699.120	Dipeptidil-peptidasa	gi 407853131	85 kDa	Citosol	Proteólisis, defosforilación de proteínas	B
TcCLB.509213.120	Peptidasa M20/M25/M40	gi 407863004 (+1)	52 kDa	Citosol	Proteólisis	B
TcCLB.510257.80	Dipeptidasa citosolica no especifica	gi 71421293	51 kDa	Citosol	Proteólisis	B
TcCLB.507641.290	Chaperonina HSP60, precursor mitocondrial	gi 407409707 (+2)	59 kDa	Mitocondria	Plegamiento proteico, ensamblado de complejos, importe a la matriz mitocondrial, metabolismo proteico	B
TcCLB.507029.30	70 kDa HSP mitocondrial	gi 205278870 (+2)	71 kDa	Mitocondria	Plegamiento proteico, patogénesis	B
TcCLB.506941.280	70 kDa HSP mitocondrial	gi 71664216	19 kDa	Mitocondria	Plegamiento proteico, patogénesis	B
TcCLB.509505.50	10 kDa HSP	gi 71410857 (+1)	20 kDa	Cito/mito	Plegamiento proteico	B
TcCLB.506135.9	70 kDa HSP	gi 71420615	30 kDa	Citosol	Plegamiento proteico, respuesta al estrés	A
TcCLB.507831.60	HSP 110	gi 407407341 (+2)	47 kDa	Citosol	Plegamiento proteico	B
TcCLB.511211.170	HSP70	gi 162117 (+3)	71 kDa	Citosol	Plegamiento proteico, respuesta al estrés	B
TcCLB.509105.140	85 kDa proteína	gi 162111 (+4)	81 kDa	Citosol	Plegamiento proteico, respuesta al estrés	B
TcCLB.509583.10	Chaperonina TCP20	gi 407411302 (+2)	59 kDa	Citosol	Plegamiento proteico, regulación del ciclo celular, metabolismo proteico	B
TcCLB.508357.90	Proteína 1 del complejo T, subunidad beta	gi 407408620 (+2)	58 kDa	Citosol	Plegamiento proteico, regulación del ciclo celular, metabolismo proteico	B
TcCLB.506925.300	Ciclofilina A, peptidil-prolil cis-trans isomerasa (CYC	gi 71659715	19 kDa	Cito/flagelo	Plegamiento proteico	B
TcCLB.509011.40	Calreticulina	gi 70877367 (+1)	46 kDa	RE	Plegamiento proteico	B
TcCLB.506585.40	Proteína regulada por glucosa 78	gi 343473174	71 kDa	RE	Plegamiento proteico, direccionamiento a la membrana co-traduccion dependiente de SRP	B
TcCLB.508707.310	Proteína rica en repeticiones de leucina	gi 407411200 (+2)	100 kDa			B
TcCLB.506321.290	Proteína inducida por estrés st1	gi 407395845 (+2)	63 kDa	Citosol	Unión de proteínas	B
TcCLB.508719.70	Proteína de direccionamiento al flagelo kharon1 (KH	gi 340366469 (+1)	44 kDa	Bolsillo flage	Direccionamiento proteico, patogénesis	B
TcCLB.509775.40	Hierro superóxido dismutasa A	gi 13488615 (+16)	23 kDa	Mitocondria	Metabolismo del superóxido, oxidación-reducción	B
TcCLB.503555.30	Trypanotio reductasa	gi 157879377 (+2)	54 kDa	Citosol	Homeostasis celular, oxidación-reducción	B
TcCLB.507259.10	Tryparredoxin peroxidasa	gi 17224953 (+2)	22 kDa	Citosol	Oxidación-reducción	B
Metabolismo						
Metabolismo de nucleótidos						
TcCLB.508989.9	Nucleósido fosforilasa	gi 407867017 (+2)	25 kDa		Metabolismo nucleósidos	B
TcCLB.507559.80	Deoxyribosa-fosfato aldolasa	gi 407402653 (+3)	29 kDa	Citosol	Catabolismo de deoxiribonucleótidos	B
TcCLB.506789.280	Metiloadenosina fosforilasa	gi 407858997 (+1)	33 kDa	Citosol	Metabolismo nucleósidos	B
Síntesis de ácidos grasos						
TcCLB.509717.20	Precursores dihidrolipoamida acetiltransferasa	gi 71665855	50 kDa	Mitocondria	Biosíntesis de acetyl-CoA a partir de piruvato	A
TcCLB.510099.120	D-isómero específico 2-hidroxiácido dehidrogenasa	gi 71420052	39 kDa		Oxidación-reducción	B
TcCLB.509213.100	3-ketoacil-CoA reductasa	gi 71649843	36 kDa	RE	Oxidación-reducción	B
TcCLB.511287.49	Aldo-keto reductasa A	gi 14279174 (+4)	32 kDa	Citosol	Oxidación-reducción, catabolismo de D-arabinosa	B
TcCLB.437545.10	3-oxo-5-alfa-esteroide 4-dehidrogenasa	gi 407846512	50 kDa	Cito/mito	Metabolismo de lípidos, glicosilación	B

Glicólisis/Gluconeogénesis						
TcCLB.509065.60	Gliceraldehído-3-Fosfato dehidrogenasa	gi 284449412	39 kDa	Glicosoma	Metabolismo de glucosa, glicólisis, oxidación-reducción	AB
TcCLB.504163.40	Fructose-bisfosfato aldolasa	gi 71414541	41 kDa	Glicosoma	Glicólisis	A
TcCLB.504105.140	Enolasa	gi 340056899	47 kDa	Citosol	Glicólisis/Gluconeogénesis	
TcCLB.510121.20	Hexokinasa	gi 19703093	52 kDa	Glicosoma	Glicólisis, metabolismo de hidratos de carbono	B
TcCLB.506529.508	Glucosa-6-Fosfato isomerasa	gi 40737779 (+2)	46 kDa	Glicosoma	Glicólisis/Gluconeogénesis	B
Síntesis/catabolismo de aminoácidos						
TcCLB.509445.39	Glutamato dehidrogenasa	gi 71403573	43 kDa	Mitocondria	Metabolismo aminoácidos	B
TcCLB.505843.10	Glutamato dehidrogenasa	gi 71407286	24 kDa	Mitocondria	Metabolismo aminoácidos, oxidación-reducción	AB
TcCLB.506857.20	Pyrrulina-5-carboxilato reductasa	gi 71650010	29 kDa	Mitocondria	Biosíntesis prolina, oxidación-reducción	A
TcCLB.510187.20	Tirosina aminotransferasa	gi 322820410 (+2)	46 kDa	Citosol	Metabolismo aminoácidos, biosíntesis	AB
TcCLB.506529.420	TcC31.28/ alanina aminotransferasa	gi 3063548 (+3)	44 kDa		Biosíntesis	B
TcCLB.510381.10	Cistationina beta-sintasa	gi 407424879	46 kDa		Biosíntesis cisteína	B
TcCLB.506247.220	Histidina amonio-liasa	gi 407404724	67 kDa	Citosol	Catabolismo histidina	B
TcCLB.511229.50	S-adenosilhomocisteína hidrolasa	gi 342186050 (+2)	21 kDa		Metabolismo	B
Ciclo TCA						
TcCLB.511575.60	Isocitrato dehidrogenasa	gi 71659757	47 kDa	Mitocondria	Ciclo TCA, metabolismo isocitrato, oxidación-reducción	AB
TcCLB.507883.109	Malato dehidrogenasa mitocondrial	gi 71414199 (+1)	32 kDa	Mitocondria	Ciclo TCA, metabolismo hidratos de carbono, oxidación-reducción	B
TcCLB.508479.340	Succinil-CoA sintetasa subunidad alfa	gi 407846446 (+1)	32 kDa	Mitocondria	Ciclo TCA, metabolismo	B
TcCLB.510717.30	2-oxoglutarato dehidrogenasa componente E1	gi 407403834 (+4)	113 kDa	Mitocondria	Ciclo TCA, oxidación-reducción, metabolismo triptofano, catabolismo lisina	B
Síntesis ATP						
TcCLB.510609.40	ATP sintasa cadena alfa, precursor mitocondrial	gi 72392138	64 kDa	Mitocondria	ATP síntesis/hidrólisis acoplada al transporte de protones	AB
TcCLB.510609.40	ATPasa subunidad alfa	gi 407859052	63 kDa	Mitocondria	ATP hidrólisis acoplada al transporte de protones	B
TcCLB.509233.180	ATPasa subunidad beta	gi 407406474 (+2)	56 kDa	Mitocondria	ATP síntesis acoplada al transporte de protones	B
Metabolismo de compuestos aromáticos						
TcCLB.509589.20	Esqualeno monooxigenasa	gi 387233512	24 kDa	Glicosoma	Metabolismo compuestos aromáticos, oxidación-reducción	A
Metabolismo isoprenoide						
TcCLB.511071.50	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa	gi 348658704	54 kDa	Mitocondria	Metabolismo isoprenoide, biosíntesis ergosterol	AB
TcCLB.509167.20	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa	gi 407416622	46 kDa	Mitocondria	Biosíntesis isoprenoide, oxidación-reducción, metabolismo coenzima A	B
Homeostasis redox						
TcCLB.503419.30	Reductasa 1 dependiente de tiol, tiol transferasa, glutathion S-transferasa	gi 32395740 (+3)	48 kDa		Homeostasis redox	B
TcCLB.511019.90	Hierro superóxido dismutasa	gi 1066332 (+6)	22 kDa	Mitocondria	Metabolismo del superóxido, oxidación-reducción	AB
TcCLB.503555.30	Trypanotio reductasa	gi 157879377 (+2)	54 kDa	Citosol	Homeostasis, oxidación-reducción	B
TcCLB.507259.10	Trypanredoxin peroxidasa	gi 17224953 (+2)	22 kDa	Citosol	Oxidación-reducción	B
TcCLB.508461.80	ProstaglandinA F2alfa sintasa	gi 340366435 (+1)	26 kDa		Oxidación-reducción	B
TcCLB.504425.60	Alcohol dehidrogenasa NADP-dependiente	gi 407868275 (+3)	37 kDa		Oxidación-reducción	B
TcCLB.503467.9	Fumarato reductasa NADH-dependiente	gi 71403387	64 kDa	Glicosoma	Oxidación-reducción	A
Respiración aeróbica						
TcCLB.506949.50	Citocromo c	gi 71414147	12 kDa	Mitocondria	Respiración aeróbica	B
TcCLB.506529.360	Citocromo c oxidasa subunidad IV	gi 407844641 (+2)	39 kDa	Mitocondria		AB
TcCLB.510819.4	NADH-citocromo b5 reductasa	gi 407424622 (+1)	33 kDa	Mitocondria	Oxidación-reducción	B
TcCLB.509395.100	Citocromo b-dominio proteico	gi 407854108 (+2)	32 kDa	Mitocondria		B

Hipotéticas						
TcCLB.506357.130	Proteína hipotética	gi 71664584	288 kDa			A
TcCLB.508785.4	Proteína hipotética	gi 71411512	47 kDa			A
TcCLB.503791.30	Proteína hipotética	gi 71408621				A
TcCLB.509047.40	Proteína hipotética	gi 407852130 (+2)	32 kDa			B
TcCLB.508693.50	Proteína hipotética	gi 71415202 (+1)	29 kDa			B
TcCLB.506605.120	Proteína hipotética	gi 407399639 (+1)	22 kDa			B
TcCLB.510877.30	Proteína hipotética	gi 407404484 (+3)	25 kDa			B
TcCLB.510725.40	Proteína hipotética	gi 71413661 (+1)	10 kDa			B
TcCLB.507793.40	Proteína hipotética	gi 71404616 (+1)	12 kDa			B
TcCLB.511529.210	Proteína hipotética	gi 342186644	16 kDa			B
TcCLB.504423.30	Proteína hipotética, conservada	gi 407403703 (+2)	100 kDa			B
TcCLB.504005.54	Proteína hipotética, conservada	gi 70870961 (+1)	12 kDa			B
TcCLB.511823.14	Proteína hipotética	gi 407426026 (+4)	74 kDa			B
TcCLB.511815.170	Proteína hipotética	gi 71651556 (+1)	61 kDa			B
TcCLB.506221.90	Proteína hipotética, conservada	gi 70834930	74 kDa			B
TcCLB.506529.140	Proteína hipotética, conservada	gi 342179939	45 kDa			B
TcCLB.511729.60	Proteína hipotética	gi 71407656	41 kDa			B
TcCLB.504199.20	Proteína hipotética	gi 71407337	16 kDa			B
TcCLB.506441.20	Proteína hipotética	gi 407832526 (+2)	111 kDa			B
TcCLB.506399.70	Proteína hipotética	gi 71414348	37 kDa	Mitocondria	Direccionamiento a la mitocondria	A
TcCLB.504147.190	Proteína hipotética, conservada	gi 342184602	21 kDa		Modificación proteica	B
TcCLB.509505.40	Proteína hipotética	gi 407853646 (+2)	40 kDa		Biosíntesis ácidos grasos	B
TcCLB.509205.120	Proteína hipotética	gi 71416575	73 kDa		Proteólisis, defosforilación proteica	B
Otras						
TcCLB.508823.70	Proteína P27	gi 71415865	28 kDa	Mitocondria	Regulación fosforilación oxidativa	A
TcCLB.509429.4	Proteína retrotransposon hot spot (RHS)	gi 70885510	101 kDa			AB
TcCLB.505373.10	Proteína retrotransposon hot spot (RHS)	gi 407834553	30 kDa			B
TcCLB.510669.20	Proteína Gim5A, proteína de membrana glicosomal	gi 407408237 (+4)	27 kDa	Glicosoma	Fisión peroxisoma	B
TcCLB.508727.9	Subunidad 10 del complejo de transcripción CCR4-NG	gi 407410148 (+1)	28 kDa	Citosol		B

NOTAS

