



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

POSTGRADO EN BIOLOGIA CELULAR

**Una Contribución al Estudio de la Ca^{2+} -ATPasa de Membrana
Plasmática de Humanos y Proteínas Reguladoras de Calcio de
Trypanosoma evansi.**

Trabajo de grado de Tesis Doctoral presentado ante la
ilustre Universidad Central de Venezuela por la Lic.
María Carolina Pérez Gordones, para optar al título
de Doctor en Ciencias. Mención Biología Celular.
Tutores:

Dra. Vincenza Cervino

Dra. Marta Mendoza.

Caracas-Venezuela

Diciembre, 2011

Resumen

Estudios recientes han demostrado la estimulación de diferentes isoformas de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) por parte del etanol (EtOH) y de segundos mensajeros de origen lipídico, los cuales presentan en su estructura molecular un grupo hidroxilo libre, como el diacilglicerol (DAG) y la ceramida. Dicha estimulación ha sido estudiada, tanto en la enzima purificada como en fragmentos de membrana, observándose en todos los casos, aditividad con la estimulación inducida por la calmodulina (CaM), principal modulador de la PMCA. En la primera parte de este trabajo, nos propusimos profundizar en la caracterización del posible sitio de acción del EtOH y sugerir los potenciales mecanismos de acción del DAG y la ceramida, sobre la enzima.

Trabajos previos realizados en el laboratorio permitieron establecer una región de interacción del EtOH con la PMCA situada en el extremo C-terminal de la enzima, cerca del dominio de unión de la CaM. Dicho resultado se obtuvo gracias a la sobreexpresión de formas truncadas de la PMCA4b de humanos. En este trabajo nos propusimos ahondar en el estudio del sitio de interacción descrito con la finalidad de acotar la región de interacción del EtOH con la enzima. Asimismo, nos propusimos caracterizar si la región de interacción del EtOH es la misma región involucrada para el DAG y la ceramida. Para ello, se expresó una forma truncada intermedia a las previamente utilizadas, como es la hPMCA4b Δ 118, para estudiar el efecto del EtOH, el DAG y la ceramida en esta proteína.

Nuestros, resultados nos permiten sugerir una región de 74 aa como el posible dominio de interacción del EtOH con la enzima. Así mismo, sugerir mecanismos de acción diferentes al del EtOH para el DAG y la ceramida, compuestos que estimularon todas las formas truncadas usadas en este trabajo y mostraron aditividad con el EtOH.

La segunda parte de este trabajo estuvo dirigida a evidenciar de manera fisiológica, molecular, inmunológica y bioquímica las proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi* y compararlas con las descritas en otros tripanosomatidios y en eucariotas superiores, con el fin de establecer posibles diferencias que puedan ser utilizadas como potenciales blancos para la generación de drogas tripanocidas.

La suma de las diferentes aproximaciones experimentales utilizadas, nos permitieron sugerir en *T. evansi*, la presencia de tres Ca^{2+} -ATPasa, las cuales presentan

10 dominios transmembrana y los 3 dominios característicos para estas enzimas, de unión a Ca^{2+} , ATP y de fosforilación. Estas fueron identificadas como: Una Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA, contentiva de un dominio no clásico de unión a CaM en el extremo C-terminal de la enzima, reconocida por anticuerpos monoclonales específicos para PMCA de *Homo sapiens* y de peso molecular similar al de sus homólogas en otros tripanosomatidios y eucariotas superiores. Una Ca^{2+} -ATPasa tipo vacuolar, carente del dominio de unión a CaM y una Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA, sensible a tapsigargina (Tg) y benzoquinonas (BHQ), la cual también es reconocida por anticuerpos específicos dirigidos contra SERCA de eucariotas superiores. Por otra parte, en este trabajo identificamos por primera vez en *T. evansi*, la presencia de canales de Ca^{2+} sensibles a 2APB, así como una secuencia aminoacídica que comparte homología con la subunidad α de canales de Ca^{2+} voltaje dependiente.

Los resultados obtenidos en esta parte de nuestro trabajo, permiten establecer un modelo con los principales mecanismos de regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular en *T. evansi*, así como establecer diferencias entre los mecanismos reportados para otros tripanosomatidios y eucariotas superiores.

Agradecimientos

- A Dios por darme la fuerza para llegar a donde estoy.
- A mi familia, por su amor infinito, apoyo constante. Son ustedes el centro de mi universo.
- A mis tutoras Dra. Vincenza Cervino y Dra. Marta Mendoza por creer en mí y darme la oportunidad de crecer. Gracias por el apoyo, confianza y el amor que me brindaron en todo momento.
- A mis amigos, por su paciencia, por regalarme bellos momentos y por darme aliento en los momentos de dificultades: Yael García, Yda Hernández, Dubravka Rodríguez, Felipe Sojo, Rafael Ghinaglia, Carolina Cortez, Iván Bello, Xenón Serrano y Adriana Mayora.
- A los miembros de la Unidad Docente de Bioquímica, por su apoyo constante durante la realización de este trabajo: Dra. Concepción Hernández, Dr. Ana Gómez, Dr. Alexander Laurentin, Dra. Meris Casotto y Lic. Mighay Lovera.
- A los miembros de mi MUD, por hacer del ratito del almuerzo una experiencia única llena de alegrías y aprendizaje: Dra. Ana Herrera, Dra. Marcia Escala, Dra. Andrea Menéndez, Dr. Wilmer Tezara, Dr. Alexis Mendoza, Dr. Francisco Arvelo, Dra. Beatriz Vera y Dra. María B. Reymúndez.
- A la Universidad Central de Venezuela y especialmente al Instituto de Biología experimental por ser la sede donde realizo mis metas.
- A las instituciones:

IBE

Laboratorio de Biofísica: Dr. Gustavo Benaim, Lic. Felipe Sojo, Lic. Adriana Mayora, Dr. Miguel Lugo y Dra. Valentina Salas.

Laboratorio de fisiología de Membrana: Dra. Concepción Hernández y Dr. Pedro Romero.

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos: Dr. Alexis Mendoza.

Laboratorio de Genética Molecular: Dra. Palmira Guevara.

Laboratorio de Cultivo de Tejido y Biología de Tumores: Dr. Francisco Arvelo y Dra. Elizabeth Merente.

Laboratorio de Limnología: Dr. Ernesto González.

Por su apoyo constante en la realización de este trabajo.

IDECYT

Laboratorio de Inmunobiología de Parásitos: Dr. Armando Reyna, Lic. Mariana Eleizalde, Lic. Lucinda Tavares, Dr. Ely Gomez, Lic. Bernardo Gonzales y Lic. David Rosales.

Por hacer de su laboratorio mi segunda casa, gracias por su ayuda constante.

IDEA

Laboratorio de Estructura Molecular: Dra. Graciela Uzcanga.

Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos: Dr. Gustavo Benaim, Dra. Yael García, Dr. Xenón Serrano, Dra. Nereida Parra.

Laboratorio de Neurobiología molecular: Dr. Juan Carlos Martínez

Por su colaboración en la elaboración de este trabajo.

IVIC

Laboratorio de Fisiología celular: Dr. Reynaldo Dipolo, Lic. Hector Rojas, Dra. Magaly Ramos, Lic. Daniel Delgado.

Laboratorio de fisiología de Parásitos: Dra. Trina Perrone †, Dra. Nereida Rojas.

Por su contribución y asesoramiento en la realización de este trabajo.

Gracias a todas aquellas personas que siempre estuvieron allí para mí. Sin ustedes no habría podido crecer como persona y como profesional en esta etapa de mi vida.

Abreviaturas

- **A:** Dominio de presentación de nucleótido
- **AA:** Acido araquidonico
- **aa:** aminoácidos
- **ADP:** Adenosin difosfato
- **AMP:** Adenosin monofosfato
- **2APB:** 2 Amino etoxidifenil borato
- **ATP :** Adenosin trifosfato
- **BHQ:** Benzohidroquinona
- **BLAST:** Herramientas de Búsqueda para alineamientos básico y local (en inglés: *Basic Local Alignment Search Tool*)
- **[Ca²⁺]_e:** Concentración de Calcio extracelular
- **[Ca²⁺]_i:** Concentración de Calcio intracelular
- **CaCl₂:** Cloruro de calcio
- **CaM:** Calmodulina
- **CCVD:** Canales de Ca²⁺ voltaje Dependiente
- **CPA:** Ac. Ciclopiazonico
- **CRAC:** Canales de Ca²⁺ activados por la liberación de Ca²⁺ (del inglés: calcium activated release calcium)
- **D:** Aspartato
- **DAG:** Diacilglicerol
- **DC:** Dominio conservado
- **DMEM:** En inglés Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
- **DMSO:** Dimetil sulfóxido
- **DNA:** Ac. Desoxirribonucleico
- **DTT:** Dithiothreitol
- **E:** Glutamato
- **E₁:** Estado conformacional 1 de la PMCA
- **E₁P:** Estado conformacional 1 fosforilado de la PMCA
- **E₂:** Estado conformacional 2 de la PMCA
- **E₂P:** Estado conformacional 2 fosforilado de la PMCA
- **EDTA:** Ac. Etilen diamino tetraacético
- **EF:** Dominio de unión a Ca²⁺
- **EGTA:** Ac. Etilen glicol tetraacético
- **EtOH:** Etanol
- **F:** Fenilalanina
- **FCCP:** P- fluorometoxifenilhidrazona
- **H⁺:** Protones
- **HVA:** De las siglas en inglés Canales activados por alto voltaje

- **I- VCa²⁺**: Ca²⁺-ATPasa vacuolar 1
- **I**: Isoleucina
- **I_{CRAC}**: Corriente de Ca²⁺ generada a través de canales CRAC
- **II- VCa²⁺**: Ca²⁺-ATPasa vacuolar 2
- **InsP3**: Inositol trifosfato
- **IQ**: Dominio de unión a CaM
- **K**: Lisina
- **K_m**: Constante de Michaelis-Menten
- **LVA**: De las siglas en inglés Canales activados por bajo voltaje
- **N**: Dominio de unión de nucleótido
- **N**: Asparagina
- **Na⁺**: Ión sodio
- **NaCl**: Cloruro de sodio
- **P**: Dominio de fosforilación
- **PBS**: Solución amortiguadora fosfato
- **PC**: Fosfatidilcolina
- **PCR**: De sus siglas en inglés reacción en cadena de la polimerasa
- **PKC**: Proteína quinasa C
- **PLC**: Fosfolipasa C
- **PM**: Peso Molecular
- **PMCA**: Ca²⁺-ATPasa de membrana Plasmática
- **PMSF**: Phenylmethylsulfonyl fluoride
- **PS**: Fosfatidilserina
- **Q**: Glutamina
- **RE**: retículo endo sarcoplasmático
- **SERCA**: Ca²⁺-ATPasa de retículo endoplasmático
- **SOC**: De sus siglas en inglés Canales de Ca²⁺ operados por reservorios
- **T. brucei**: *Trypanosoma brucei*
- **T. cruzi**: *Trypanosoma cruzi*
- **T. evansi**: *Trypanosoma evansi*
- **T. vivax**: *Trypanosoma vivax*
- **TBS**: Solución amortiguadora Tris
- **TEVA1**: Aislado venezolano de *T. evansi*
- **Tg**: Tapsigargina
- **TM**: Dominio transmembrana
- **V**: Valina
- **VCa²⁺**: Ca²⁺-ATPasa vacuolar
- **V_{max}**: Velocidad máxima

Índice General

Resumen	i
Agradecimientos	iii
Abreviaturas	v
Índice General	vii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tablas	xiii
1. Introducción	1
1.1. Papel del Ca^{2+} en eucariotas superiores y tripanosomatidios	1
1.2. Sistemas de transporte involucrados en la homeostasis de Ca^{2+} en eucariotas superiores y tripanosomatidios	3
1.2.1. Sistemas de transporte de Ca^{2+} en la membrana plasmática	3
1.2.1.1. Canales Ca^{2+}	3
• Canales voltaje dependiente	3
• Canales de Ca^{2+} operados por reservorio (SOC)	5
• Canales de Ca^{2+} en tripanosomatidios	6
1.2.1.2. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	8
1.2.1.2.1. Sistemas de Transporte de Ca^{2+} tipo intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en tripanosomatidios	8
1.2.1.3. Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA)	8
1.2.1.3.1. Ciclo catalítico de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática	10
1.2.1.3.2. Isoformas de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática	12
1.2.1.3.3. Mecanismos de Modulación de la Ca^{2+} -ATPasa	13
• Modulación por la calmodulina (CaM)	14
• Modulación por proteínas quinasa A y C	15
• Modulación por solventes orgánicos	16
• Modulación por el etanol	17
• Modulación por Lípidos	18
• Modulación por Diacilglicerol	23
1.2.1.3.4. PMCA en tripanosomatidios	24
1.2.2. Sistemas de transporte intracelulares de Ca^{2+}	25
1.2.2.1. Sistema de transporte de Ca^{2+} en retículo endoplasmático	26
1.2.2.1.1. Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplasmático (SERCA)	26
1.2.2.1.2. Canales ligando dependiente en el retículo endoplasmático	28
1.2.2.1.3. Sistema de transporte de Ca^{2+} en retículo endoplasmático en tripanosomatidios	28
1.2.2.2. Sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial	29
1.2.2.2.1. Sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial en tripanosomatidios	30
1.2.2.3. Otros sistemas de transporte de Ca^{2+} a nivel intracelular en tripanosomatidios (Sistema de transporte de Ca^{2+} a nivel de acidocalsisoma)	31
1.3. Tripanosomiasis	32
1.3.1. <i>Trypanosoma evansi</i>	33
2. Objetivos	35
3. Metodología	37
3.1. Reactivos	37
3.2. Metodología usada para tratar de establecer el sitio de interacción del etanol con la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, así como estudiar el efecto del diacilglicerol y la ceramida sobre la Ca^{2+} -ATPasa y tratar de establecer el sitio de interacción y posible mecanismo de acción de estos segundos mensajeros sobre la enzima .	37
3.2.1. Material Biológico	37
• Cultivo de <i>Escherichia coli</i> (DH5 α)	37

• Cultivo de las células COS-7	37
3.2.2. Procesamiento del material biológico	38
• Preparación de membranas de células COS-7 expresadas	38
• Obtención de fantasmas de eritrocitos humanos libres de calmodulina	38
• Purificación de la Ca ²⁺ -ATPasa de eritrocitos humanos	39
• Ensayo enzimático acoplado para la determinación de la actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa	40
• Determinación de la concentración de proteínas	40
3.2.3. Métodos Moleculares	40
• Preparación de células químicamente competentes	40
• Transformación	41
• Aislamiento del ADN plasmídico mediante "Mini-Prep"	41
• Digestión con enzimas de restricción de los plásmidos con la secuencia correspondiente a la proteína nativa y las formas truncadas	42
• Aislamiento del DNA plasmídico mediante "Maxi-Prep"	42
• Geles de agarosa	43
• Expresión de las proteínas PMCA nativa y truncadas en células COS-7 mediante transfección con lipofectamina	43
• Expresión de las proteínas PMCA nativa y truncadas en células COS-7 mediante transfección con Calcio-Fosfato	44
3.2.4. Métodos Bioquímicos e Inmunológicos	44
• Determinación de la actividad Ca ²⁺ -ATPasa mediante determinación de fósforo inorgánico (Fiske & Subbarow)	44
• Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (SDS-page)	45
• Tinción con plata	46
• Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa	46
• Inmunomarcaje	46
• Análisis Estadístico	47
3.3. Metodología usada para profundizar en la caracterización fisiológica, molecular, inmunológica y bioquímica de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	47
3.3.1. Material Biológico	47
• <i>Trypanosoma evansi</i> (Mantenimiento y obtención de <i>Trypanosoma evansi</i>)	47
• Purificación de <i>Trypanosoma evansi</i>	48
3.3.2. Procesamiento del material biológico	48
• Obtención de vesículas de membrana plasmática de <i>Trypanosoma evansi</i>	48
• Evaluación de los niveles Ca ²⁺ intracelular en poblaciones de <i>Trypanosoma evansi</i> por espectrofluorometría	49
3.3.3. Métodos Moleculares	50
• Aislamiento del ADN genómico de <i>Trypanosoma evansi</i>	50
• Diseño de los oligos empleados	50
• Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	52
3.3.4. Análisis de las secuencias nucleotídica "in silico"	53
• Ensamblaje de la secuencia consenso de cada gen de interés.	53
• Caracterización de la secuencias obtenidas "in silico"	53
• Programas para la búsqueda de Similaridad	53
• Programa de búsqueda de dominios	53
• Programas de predicción topográfica	54
• Programas de análisis de estructura primaria	54
• Programas de modelaje molecular	54
3.3.5. Métodos Inmunológicos	54
• Inmunomarcaje	54

• Inmunolocalización empleando confocal	56
• Inmunoprecipitación	57
3.3.6. Métodos Bioquímicos	57
• Determinación de la actividad Ca ²⁺ -ATPasa en Vesículas de Membranas Plasmática de <i>Trypanosoma evansi</i>	57
• Purificación de la Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma evansi</i> mediante cromatografía de afinidad.	58
• Marcaje con calmodulina biotinilada	58
4. Resultados	59
4.1. Modulación de la Ca ²⁺ ATPasa 4b de humanos por Etanol y segundos mensajeros de origen lipídicos	59
4.1.1. Estandarización del sistema de expresión COS-7	59
4.1.2. Efecto del Etanol sobre la forma truncada PMCA4bΔ118 expresada	68
4.1.3. Efecto del Diacilglicerol sobre la actividad de formas truncadas de la isoforma PMCA4b	72
4.1.4. Efecto de la ceramida sobre la actividad de formas truncada de la isoforma PMCA4b	76
4.2. Caracterización fisiológica, molecular, inmunológica y bioquímica de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	80
4.2.1. Evidencias fisiológicas de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	81
4.2.1.1. Evaluación del efecto de los inhibidores específicos de SERCA sobre los niveles de Ca ²⁺ intracelular mediante microespectrofluorometría en parásitos cargados con FURA-2AM	81
4.2.1.2. Evaluación del inhibidor 2APB sobre el aumento en la [Ca ²⁺] _i producido por TG y BHQ en presencia de Ca ²⁺ extracelular.	84
4.2.2. Evidencias moleculares de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	86
4.2.2.1. Identificación molecular de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	86
• Selección de las posibles Ca ²⁺ -ATPasa en el genoma de <i>Trypanosoma brucei</i> e identificación de los dominios característicos para las Ca ²⁺ -ATPasas	86
4.2.2.2. Caracterización molecular de las posibles Ca ²⁺ -ATPasas vacuolares seleccionadas	90
4.2.2.2.1. Obtención de las secuencias nucleotídica de las posibles Ca ²⁺ -ATPasa vacuolares (V-Ca ²⁺ -ATPasa)	90
• Amplificación por PCR y secuenciación de la I-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	90
• Caracterización de los dominios funcionales presentes en la I-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	94
• Identificación de posibles dominios transmembrana presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	95
• Análisis de la presencia de dominios de unión a CaM en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	97
• Análisis de similitud y homología de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	98
• Modelo Topológico de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	102
4.2.2.2.2. Caracterización molecular de la II-VCa ²⁺ -ATPasas de <i>Trypanosoma evansi</i>	105
• Amplificación por PCR y secuenciación de la II-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	105
• Caracterización de los dominios funcionales presentes en la II-VCa ²⁺ -	109

	ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	
	• Identificación de posibles dominios transmembrana presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo vacuolar de <i>Trypanosoma evansi</i>	110
	• Análisis de la presencia de dominios de unión a CaM en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo vacuolar de <i>Trypanosoma evansi</i>	111
	• Análisis de similitud y homología de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo vacuolar de <i>Trypanosoma evansi</i>	112
	• Modelo Topológico de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo vacuolar de <i>Trypanosoma evansi</i>	116
4.2.2.2.3.	Caracterización molecular de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	118
	• Amplificación por PCR y secuenciación de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	118
	• Caracterización de los dominios funcionales presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	122
	• Identificación de los posibles dominios transmembrana presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	123
	• Análisis de la presencia de dominios de unión a CaM en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	125
	• Análisis de similitud y homología de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	126
	• Dominios de Interacción de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i> con inhibidores clásicos de SERCA	130
	• Modelo topológico de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	131
4.2.2.2.4.	Caracterización molecular del Putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	133
	• Amplificación por PCR y secuenciación del Putativo canal Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	133
	• Caracterización de los dominios funcionales presentes en Putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	139
	• Identificación de los posibles dominios transmembrana presentes en el putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	140
	• Análisis de la presencia de posibles dominios de unión a CaM en el Putativo Canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	141
	• Análisis de similitud y homología de Putativo Canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	142
	• Modelo topológico del putativo Canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	152
4.2.3.	Evidencias inmunológicas de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	154
4.2.3.1.	Reconocimiento inmunológico de las posible proteínas involucradas en la homeostasis del Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i> mediante inmunotinción	155
4.2.3.2.	Inmunolocalización de las posible PMCA, SERCA y Canal de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i> , mediante el uso de microscopia confocal	156
4.2.3.3.	Inmunoprecipitación	157
4.2.4.	Evidencias bioquímicas de la presencia de la posible Ca ²⁺ -ATPasa de membrana de <i>Trypanosoma evansi</i>	159
4.2.4.1.	Evaluación de la actividad Ca ²⁺ -ATPasa en vesículas de membrana plasmática de <i>Trypanosoma evansi</i>	159
4.2.4.2.	Marcaje de la posible Ca ²⁺ -ATPasa de membrana de <i>Trypanosoma evansi</i> con CaM Biotinilada.	160
4.2.4.3.	Purificación de la posible Ca ²⁺ -ATPasa de membrana (Cromatografía de afinidad con CaM-Sefarosa)	161
5.	Discusión	163
5.1.	Modulación de la Ca ²⁺ ATPasa 4b de humanos por etanol y segundos	163

mensajeros de origen lipídicos

5.1.1.	Estandarización del Sistema de Expresión COS-7	163
5.1.2.	Efecto del Etanol sobre la forma truncada $\Delta 118$	167
5.1.3.	Efecto del Diacilglicerol y Ceramida sobre la PMCA 4b y la las formas truncadas PMCA 4b $\Delta 44$, PMCA 4b $\Delta 118$ y PMCA 4b $\Delta 139$	171
5.2.	Caracterización fisiológica, molecular, inmunológica y bioquímica de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma evansi</i> .	175
5.2.1.	Evidencias fisiológicas de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma evansi</i> .	176
5.2.2.	Evidencias moleculares de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma evansi</i> .(Identificación molecular de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma evansi</i>).	178
5.2.3.	Caracterización de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA en <i>Trypanosoma evansi</i> .	178
5.2.4.	Caracterización de la posible Ca^{2+} -ATPasa vacuolar en <i>Trypanosoma evansi</i> .	180
5.2.5.	Caracterización de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA en <i>Trypanosoma evansi</i> .	180
5.2.6.	Caracterización del posible canal putativo de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma evansi</i>	184
6.	Conclusiones.	187
7.	Referencias	189

Índice de Figuras

Figura 1.	Principales mecanismos responsables de la homeostasis de Ca^{2+} en eucariotas superiores y tripanosomatidios	2
Figura 2.	Estructura topológica de canales de Ca^{2+} voltaje dependiente	5
Figura 3.	Modelo estructural de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática	10
Figura 4.	Ciclo catalítico de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática	11
Figura 5.	Síntesis de esfingolípidos	22
Figura 6.	Modelo de la regulación de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática por diacilglicerol	24
Figura 7.	Modelo de la Ca^{2+} -ATPasa de retículo endo sarco plasmático	27
Figura 8.	Modelo esquemático de acidocalcisoma	32
Figura 9.	Esquema de construcción de los plásmidos pSG5-PMCA4b silvestre, PMCA4b $\Delta 44$, PMCA4b $\Delta 118$ y PMCA4b $\Delta 139$	60
Figura 10.	Construcción de los plásmidos pSG5-PMCA4b silvestre, PMCA4b $\Delta 44$, PMCA4b $\Delta 118$ y PMCA4b $\Delta 139$	62
Figura 11.	Amplificación a gran escala y caracterización de plásmidos pSG5-PMCA4b silvestre, PMCA4b $\Delta 44$, PMCA4b $\Delta 118$ y PMCA4b $\Delta 139$	63
Figura 12.	Caracterización inmunológica de la expresión del PMCA 4b y sus formas truncadas en el sistema de expresión COS-7	65
Figura 13.	Caracterización funcional de la expresión del PMCA 4b y sus formas truncadas en el sistema de expresión COS-7	66
Figura 14.	Actividad basal correspondiente a la isoforma PMCA4b y formas truncadas expresadas	67
Figura 15.	Estimulación por EtOH de la isoforma PMCA4b y sus diferentes formas truncadas	69
Figura 16.	Estimulación de la isoforma PMCA4b y sus diferentes formas truncadas por EtOH y calmodulina	70
Figura 17.	Composición aminoacídica del posible dominio de interacción del EtOH en la PMCA4b	71
Figura 18.	Hidrofobicidad del posible dominio de interacción del EtOH en la PMCA4b	72
Figura 19.	Estimulación de la isoforma PMCA4b y sus formas truncadas por diacilglicerol	74
Figura 20.	Estimulación de la isoforma PMCA4b y sus formas truncadas por diacilglicerol y	75

su aditividad con EtOH y CaM

Figura 21. Estimulación de la isoforma PMCA4b y sus formas truncadas por ceramida	77
Figura 22. Estimulación de la isoforma PMCA4b y sus formas truncadas por ceramida y su aditividad con EtOH y CaM	78
Figura 23. Estimulación de la PMCA purificada de eritrocitos humanos por diacilglicerol, ceramida y fosfatidilserina	80
Figura 24. Efecto de la tapsigargina, benzohidroquinona y Ac. ciclopiazónico sobre la concentración citosólica de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	83
Figura 25. Efecto aditivo de la tapsigargina y benzohidroquinona sobre la concentración citosólica de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	83
Figura 26. Efecto del 2APB sobre la concentración citosólica de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	85
Figura 27. Alineamiento de secuencias de posibles Ca ²⁺ -ATPasa en <i>Trypanosoma brucei</i>	88
Figura 28. Amplificación por PCR de dominios conservados de posibles Ca ²⁺ -ATPasas en <i>Trypanosoma evansi</i>	89
Figura 29. Productos de PCR de la posible I-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	91
Figura 30. Secuencia nucleotídica de la posible I-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	92
Figura 31. Secuencia aminoacídica de la posible I-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	93
Figura 32. Dominios funcionales presentes en la posible I-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	95
Figura 33. Posibles dominios transmembrana presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	96
Figura 34. Dominios no convencionales de unión a calmodulina presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	97
Figura 35. Alineamiento de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i> con PMCA reportadas en otros tripanosomatídios y PMCA de humanos	102
Figura 36. Modelo topológico de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	103
Figura 37. Modelo tridimensional de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	104
Figura 38. Productos de PCR de la posible II-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	106
Figura 39. Secuencia nucleotídica de la posible II-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	107
Figura 40. Secuencia aminoacídica de la posible II-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	108
Figura 41. Dominios funcionales presentes en la posible II-VCa ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma evansi</i>	109
Figura 42. Posibles dominios transmembrana presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo vacuolar de <i>Trypanosoma evansi</i>	110
Figura 43. Dominios no convencionales de unión a calmodulina presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo vacuolar de <i>Trypanosoma evansi</i>	111
Figura 44. Alineamiento de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo vacuolar de <i>Trypanosoma evansi</i> con PMCA reportadas en otros tripanosomatídios y PMCA de humanos	115
Figura 45. Modelo topológico de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo vacuolar de <i>Trypanosoma evansi</i>	117
Figura 46. Modelo tridimensional de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo vacuolar de <i>Trypanosoma evansi</i>	118
Figura 47. Productos de PCR de posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	120
Figura 48. Secuencia nucleotídica de posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	121
Figura 49. Secuencia aminoacídica de posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	122
Figura 50. Dominios funcionales presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	123
Figura 51. Posibles dominios transmembrana presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	124
Figura 52. Dominios no convencionales de unión a calmodulina presentes en la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	125

Figura 53. Alineamiento de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i> con SERCAs reportadas en otros tripanosomatídios y SERCA de humanos	130
Figura 54. Modelo topológico de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	132
Figura 55. Modelo tridimensional de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	133
Figura 56. Productos de PCR de putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	134
Figura 57. Secuencia nucleotídica de putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	136
Figura 58. Secuencia aminoacídica de putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	138
Figura 59. Dominios funcionales presentes en el putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	139
Figura 60. Posibles dominios transmembrana presentes en el putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	140
Figura 61. Dominios no convencionales de unión a calmodulina presentes en el putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	142
Figura 62. Alineamiento del putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i> con canales putativos de Ca ²⁺ reportados en otros tripanosomatídios y humanos	150
Figura 63. Modelo topológico del putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	152
Figura 64. Modelo tridimensional del putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	154
Figura 65. Inmunomarcaje de fracciones de membrana plasmática y homogenato de <i>Trypanosoma evansi</i>	155
Figura 66. Inmunolocalización de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	158
Figura 67. Inmunoprecipitación de posible PMCA, SERCA y canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	159
Figura 68. Actividad Ca ²⁺ -ATPasa en vesículas de membrana plasmática de <i>Trypanosoma evansi</i> y su modulación por calmodulina	160
Figura 69. Reconocimiento de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i> por Calmodulina biotinilada	161
Figura 70. Purificación de la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	162
Figura 71. Efecto del etanol sobre las formas truncadas de la PMCA4b	169
Figura 72. Efecto del etanol y calmodulina sobre formas truncadas de PMCA4b	171
Figura 73. Modelo de homeostasis de Ca ²⁺ en <i>Trypanosoma evansi</i>	186

Índice de Tablas

Tabla 1. Concentración intracelular de Ca ²⁺ en tripanosomatídios	2
Tabla 2. Isoformas alternativas de PMCA y sus nomenclaturas más comunes	12
Tabla 3. Isoformas de PMCA de mayor expresión y sus anticuerpos	13
Tabla 4. Oligos de dominios conservados de la Ca ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma brucei</i>	51
Tabla 5. Oligos de dominios no conservados ubicados aleatoriamente en las secuencias de posible PMCA, VCa ²⁺ y SERCA en <i>Trypanosoma brucei</i>	51
Tabla 6. Oligos de dominios específicos de putativo canal de Ca ²⁺ de <i>Trypanosoma brucei</i>	52
Tabla 7. Anticuerpos usados para inmunomarcaje	55
Tabla 8. Anticuerpos utilizados para inmunolocalización	56
Tabla 9. Inhibidores de mecanismos de transporte de Ca ²⁺	81
Tabla 10. Secuencias de dominios conservados para ATPasas de Ca ²⁺ en <i>T. brucei</i> seleccionadas por BLAST usando la base de datos <i>GeneDB</i>	87
Tabla 11. Posibles dominios transmembrana de posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA en <i>Trypanosoma evansi</i>	96
Tabla 12. Secuencias homólogas a la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA en <i>Trypanosoma evansi</i>	98
Tabla 13. Porcentaje de homología entre secuencias alineadas con la posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo PMCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	99
Tabla 14. Posibles dominios transmembrana de posible Ca ²⁺ -ATPasa tipo VCa ²⁺ de <i>Trypanosoma evansi</i>	111

Tabla 15. Secuencias homólogas a la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo VCa^{2+} de <i>Trypanosoma evansi</i>	112
Tabla 16. Porcentaje de homología entre secuencias alineadas con la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo VCa^{2+} de <i>Trypanosoma evansi</i>	113
Tabla 17. Posibles dominios transmembrana de posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	124
Tabla 18. Secuencias homólogas a la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	126
Tabla 19. Porcentaje de homología entre secuencias alineadas con la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de <i>Trypanosoma evansi</i>	127
Tabla 20. Dominios involucrados en la inhibición de SERCA	131
Tabla 21. Posibles dominios transmembrana de putativo canal de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma evansi</i>	141
Tabla 22. Secuencias homólogas al putativo canal de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma evansi</i>	143
Tabla 23. Porcentaje de homología entre secuencias alineadas con putativo canal de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma evansi</i>	144

1. Introducción

1.1. Papel del Ca^{2+} en eucariotas superiores y tripanosomatidios

El Ca^{2+} es un regulador biológico universal. Este segundo mensajero está involucrado en procesos que van desde la fertilización de la célula hasta su muerte controlada (Strehler y col., 2008), pasando por: división, movilidad, secreción, metabolismo energético y señalización celular (Brini y Carafoli, 2009). La gran mayoría de los eucariotas superiores mantienen un marcado gradiente entre la concentración de Ca^{2+} libre en su citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (50 a 100 nM) y el de su entorno extracelular (≤ 2 mM) (Carafoli, 1987).

En eucariotas inferiores como los tripanosomatidios, el Ca^{2+} también juega un papel importante en el desarrollo de funciones vitales, tales como: movimiento flagelar (Holwill y col. 1976), diferenciación morfológica (Morrow y col. 1981), despolarización de microtúbulos (Dolan y col. 1986), invasión de células hospedadoras (Docampo y Moreno, 1996) y en el mecanismo de evasión de la respuesta inmune humoral o variación antigénica (Voorheis y Martín 1981, Voorheis y col. 1982, Mendoza y col. 2008), entre otras. Por su parte, se conoce que estos hemoparásitos mantienen igualmente un marcado gradiente entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el de su entorno extracelular. Por otra parte, algunos de estos parásitos están sometidos a cambios drásticos en la concentración extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) durante su ciclo de vida.

La diferencia de más de cuatro órdenes de magnitud entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ tanto en eucariotas superiores como en los diferentes tripanosomatidios (Tabla 1), hace evidente la necesidad de la regulación citosólica de este catión (Carafoli, 1991 y Moreno y Docampo, 2003).

La homeostasis de Ca^{2+} en células eucariotas es un proceso complejo, el cual involucra una gran variedad de sistemas de transporte del catión (Brini y Carafoli, 2009). Estos sistemas garantizan la regulación eficiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, condición necesaria para que el Ca^{2+} ejerza su función como segundo mensajero. Estos sistemas pueden dividirse en dos grandes grupos: Los presentes a nivel de membrana plasmática y los presentes a nivel intracelular o en los organelos. En la figura 1, se esquematizan los principales sistemas involucrados en la homeostasis de Ca^{2+} de eucariotas superiores (Fig. 1-A), así

como sus proteínas homólogas identificadas en eucariotas inferiores como tripanosomatidios (Fig. 1-B).

Tabla 1. Concentración Intracelular de Ca^{2+} en Tripanosomatidios

Tripanosomatidio	$[Ca^{2+}]_i$, nM	Referencia
<i>T. cruzi</i>		
Epimastigotes	10 -150	Moreno y col., 1992a Oz y col., 1992 Vercesi y col., 1991
Amastigotes	10 - 20	Docampo, 1993
Tripomastigotes	10 - 20	Docampo, 1993
<i>T. brucei</i>		
Tripomastigotes	20 - 98	Ruben y col., 1991 Moreno y col., 1992b
Prociclica	90 -100	Moreno y col., 1992b
<i>T. evansi</i>	100	Mendoza y col., 2001
<i>L. braziliensi</i>	30 - 50	Benaim y col., 1990
<i>L. donovani</i>	50 -100	Vercesi y Docampo 1992

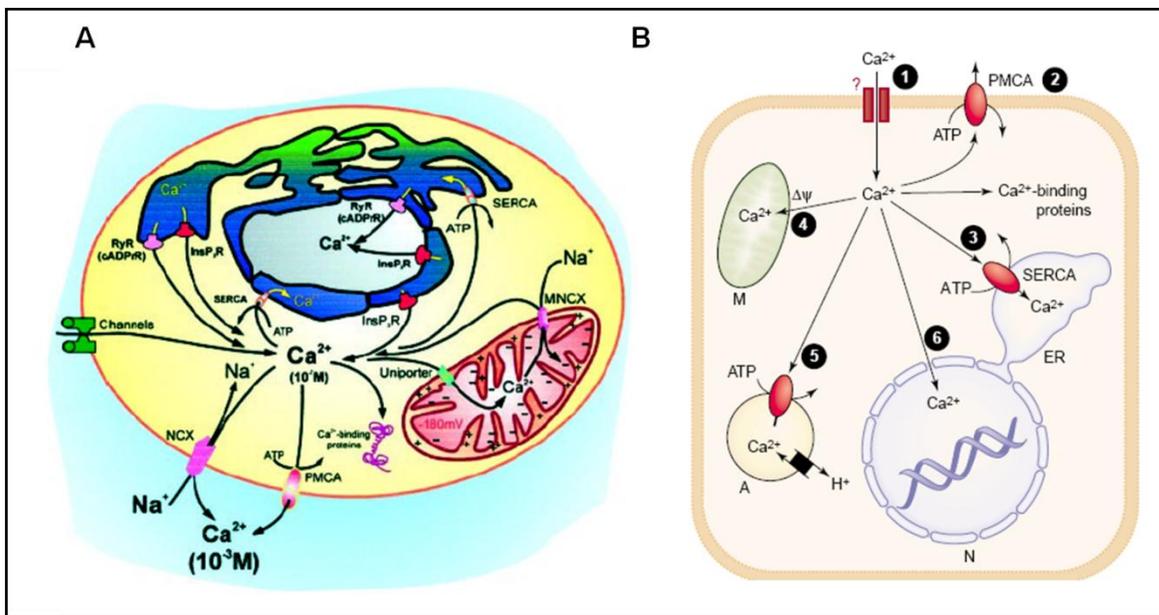


Figura 1. Principales mecanismos responsables de la homeostasis de Ca^{2+} en eucariotas superiores y tripanosomatidios. **A:** en la figura se encuentran representados en la membrana: bomba de Ca^{2+} tipo "P" (PMCA), canales de Ca^{2+} voltaje dependiente y activados por vaciado de reservorios, intercambiador Ca^{2+}/Na^{+} . En el citoplasma: proteínas que unen al Ca^{2+} . En la mitocondria: un uniporte electroforético, intercambiador Ca^{2+}/Na^{+} y depósitos de fosfato de Ca^{2+} . En el retículo endo-(sarco)-plasmático: canales de Ca^{2+} y de la bomba de Ca^{2+} tipo "P" (SERCA). (Tomado de Carafoli, 2002). **B:** Se amplifica el interior del parásito y se representa el movimiento de Ca^{2+} en este organismo. El Ca^{2+} se incorpora a través de canales específicos (1). Una vez dentro, el catión puede nuevamente ser transportado a través de la membrana plasmática gracias a la presencia de la PMCA (2). En el citoplasma, el Ca^{2+} interactúa con proteínas altamente afines que permiten su almacenamiento en el retículo endoplasmático gracias a SERCA (3), en la mitocondria el transporte de Ca^{2+} ocurre a través de un uniporte electroforético (4), en los acidocalcisoma el

Ca^{2+} es transportado a su interior gracias a una Ca^{2+} -ATPasa vacuolar y en el núcleo el Ca^{2+} puede entrar por difusión libre. (Tomado de Moreno y Docampo, 2003).

1.2. Sistemas de transporte involucrados en la homeostasis de Ca^{2+} en eucariotas superiores y tripanosomatidios

1.2.1. Sistemas de transporte de Ca^{2+} en la membrana plasmática

A nivel de la membrana plasmática en eucariotas superiores se ha descrito un único sistema de entrada del catión, el cual está constituido por una gran variedad de familias de canales de Ca^{2+} y dos sistemas para la expulsión de Ca^{2+} , el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la bomba de Ca^{2+} o Ca^{2+} -ATPasa (PMCA). De estos tres sistemas transportadores de Ca^{2+} en los tripanosomatidios, sólo se tienen evidencias de la presencia de una Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA, no habiéndose descrito aún la presencia directa ni de canales de Ca^{2+} , ni de un posible intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Moreno y Docampo, 2003).

1.2.1.1. Canales de Ca^{2+}

La gran variedad de familias de canales de Ca^{2+} , presentes a nivel de la membrana plasmática, se dividen en: Canales activados por voltaje o voltaje dependiente (CCVD), los cuales conducen la entrada del catión tras la despolarización de la membrana (Catterall, 2000); Canales activados por ligando, los cuales son receptores que abren el poro permeable a Ca^{2+} tras la unión de mensajeros químicos específicos (Benoff y col., 2007) y Canales activados por el vaciado de reservorios, también conocidos como canales SOC (Potier y Trebak, 2008).

Canales Ca^{2+} voltaje Dependiente

Los CCVD median la entrada de Ca^{2+} al interior celular en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática. Estudios electrofisiológicos identifican varios tipos de corrientes de Ca^{2+} que permiten clasificar a esta gran familia de canales en dos grandes grupos: Los activados por alto voltaje (HVA) y los activados por bajo voltaje (LVA) (Benoff y col., 2007 y Findeisen y Minor, 2010). Las corrientes inducidas por los canales HVA, son inactivadas lentamente mientras que las inducida por los LVA muestran una rápida inactivación por lo que se clasifican como canales de corriente “transitoria” o del tipo T. Todas las corrientes inducidas por canales tipo T son sensibles a antagonistas

orgánicos como la dihidropiridina, mientras que las corrientes inducidas por HVA se subdividen en función a su resistencia o insensibilidad a la dihidropiridina (canales tipo A, B y E), canales que a su vez son caracterizados por su sensibilidad a toxinas y venenos provenientes de arácnidos (canales tipo L) (Catterall, 2000 y Benoff y col., 2007).

Los CCVD son heteromultiméricos, compuestos por una subunidad $\alpha 1$ ensamblada con subunidades auxiliares como: la subunidad β , la subunidad $\alpha 2\delta$, Calmodulina (CaM) y en algunas ocasiones una subunidad γ (Xu y Colecraft, 2009). La subunidad $\alpha 1$ es la responsable de la formación del poro (Fig.2) y su estructura es altamente conservada en todos los miembros de esta familia de canales. Esta subunidad se compone de cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno conformado por seis segmentos transmembrana (S_1 - S_6), donde el cuarto de estos segmentos (S_4) presenta una gran proporción de aminoácidos cargados positivamente, que actúan como sensores de voltaje del canal. Otra característica en esta subunidad, es que entre los segmentos transmembrana S_5 y S_6 de cada dominio, está presente una región P o dominio de selectividad del catión. Este dominio P es altamente conservado en eucariotas superiores, manteniéndose los motivos FXXTXEGW y/o FXXTGEXW, donde E corresponde a un residuo de Glutamato, también conocido como residuo de selectividad y X a cualquier otro aminoácido (aa) (Catterall, 2000). Esta subunidad también se caracteriza por presentar hacia su extremo C-terminal dos dominios sensores de Ca^{2+} (LA o EF) y un dominio de unión a CaM (IQ), los cuales son requeridos para la inactivación del canal por Ca^{2+} (Abernethy y Soldatov, 2002 y Kobrinisky y col., 2005).

Las subunidades auxiliares β , $\alpha 2\delta$ y γ , modulan las propiedades biofísicas, así como el correcto anclaje a la membrana plasmática. La subunidad β , la cual es regulada por cAMP, modula los niveles de expresión de la subunidad $\alpha 1$, la amplitud de la corriente, la sensibilidad de la corriente de Ca^{2+} al pH, la dependencia de voltaje para la activación e inactivación del canal, así como la permeabilidad del catión, dado que estabiliza la unión del Ca^{2+} al filtro de selectividad del canal (Benoff y col., 2007). La subunidad $\alpha 2\delta$, por su parte, se postula que participa en el tráfico de la subunidad $\alpha 1$ a la membrana, en la dependencia de voltaje del canal y estabilizando la unión de drogas en la subunidad $\alpha 1$ (Striessnig, 1991). La función de la subunidad γ , es menos conocida, asociándosele una relación directa con la reducción de la corriente de Ca^{2+} (Benoff y col., 2007).

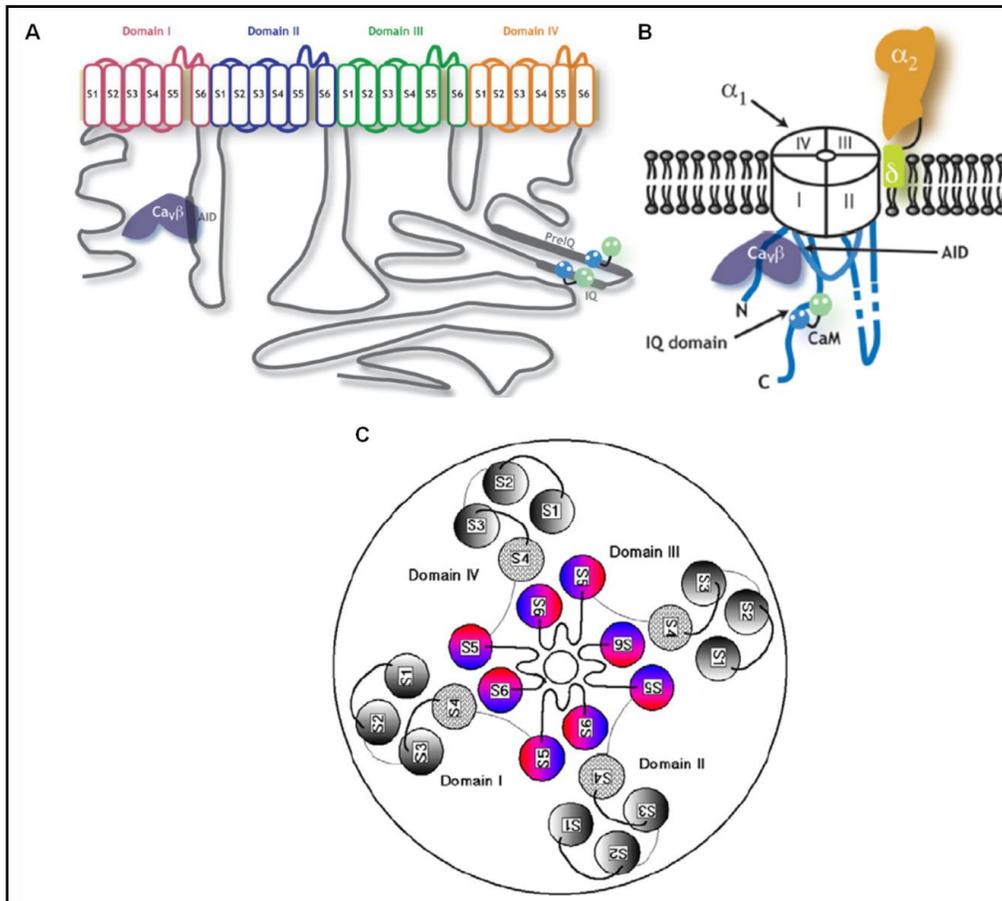


Figura 2. Estructura topológica de canales de calcio voltaje dependiente. A: Topología de la subunidad α_1 formadora del poro del canal. El esquema muestra los dominios de unión de la subunidad β y dominios de unión a Ca^{2+} y CaM (IQ). En la figura **B:** Diagrama que representa el canal de Ca^{2+} voltaje dependiente y los dominios de unión de la subunidad β y CaM. Figura tomada de (Findeisen y Minor, 2010) **C:** Vista aérea de la subunidad α_1 formadora del poro. Las líneas oscuras indican segmentos extracelulares, líneas claras indican segmentos intracelulares. Los segmentos intracelulares que conectan cada dominio (I-IV) no se muestran en el esquema. El filtro de selectividad P y los segmentos transmembrana S_5 y S_6 conforman el poro del canal. El segmento S_4 de cada dominio corresponde al sensor de voltaje del canal (Tomado de Benoff y col., 2007).

Canales de Ca^{2+} operados por reservorio (SOC)

La entrada de Ca^{2+} a través de canales operados por el vaciado de reservorios es uno de los mecanismos de entrada del catión más importante, tanto en células excitables como no excitables (Salio y col., 2009). Esta entrada de Ca^{2+} activada por la liberación de Ca^{2+} , también conocida como entrada capacitativa o SOCE (siglas en ingles para “store-operated Ca^{2+} entry”), es el principal mecanismo de entrada del catión a la célula (Potier y Trebak, 2008).

La entrada capacitativa de Ca^{2+} involucra una variedad de canales con diferentes propiedades biofísicas. Los primeros canales de este tipo identificados, fueron los responsables de las corrientes I_{CRAC} , los cuales se caracterizan por ser voltaje independientes, rectificadores y altamente selectivos para Ca^{2+} (Parekh y Putney, 2005). Recientemente, se han encontrado otros tipos de corrientes generadas por la apertura de canales similares conocidas como corrientes SOC (I_{SOC}), las cuales presentan una mayor conductancia que las I_{CRAC} pero una menor selectividad por el Ca^{2+} no discriminando entre Na^+ , K^+ , Cs^+ , Ba^{2+} o Sr^{2+} (Salido y col., 2009).

La naturaleza de los canales que conducen I_{CRAC} e I_{SOC} han sido material de intensa investigación, y su estudio ha sido posible gracias al uso de inhibidores específicos de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarco-endoplasmático (SERCA) como tapsigargina (Tg), ácido ciclopiazónico (CPA) y benzohidroquinona (BHQ), los cuales inducen el vaciado del retículo endoplasmático, así como también mediante el uso de quelantes de Ca^{2+} como BAPTA (Parekh y Putney, 2005). Recientemente, la proteína Orai1, también conocida como modulador CRAC ha sido propuesta como la responsable de la formación del poro de los canales que median I_{CRAC} (Potier y Trebak, 2008). El poro de este canal está constituido por cuatro subunidades de Orai1, cada una constituida por 301 aa, presentando 4 dominios transmembrana (Salido y col., 2009). El canal formado por Orai1, es regulado por el vaciado de reservorios gracias a la participación de una proteína sensora de Ca^{2+} presente en el retículo endoplasmático conocida como STIM1. Por otra parte, se ha sugerido a la gran familia de proteínas TRP ("*transient receptor potential*") como componentes de canales tipo SOC, las cuales también son activadas por la proteína sensora STIM1 (Worley y col., 2007).

Canales de Ca^{2+} en tripanosomatidios

Hasta el momento, no se conocen las moléculas capaces de generar una respuesta que inicie la entrada de Ca^{2+} al citosol en los tripanosomatidios. Sin embargo, la reciente dilucidación de los genomas de varios tripanosomatidios, ha arrojado la posibilidad de la existencia de canales putativos del catión, a los cuales aun no se les ha caracterizado funcionalmente (Bridges y col., 2008). Por otra parte, en los últimos años se han reportado algunos trabajos fisiológicos que sugieren la existencia de diferentes mecanismos de entrada de Ca^{2+} en *T. cruzi* (Catisti, 2000), *T. brucei* (Ruben y col. 1996) y *T. evansi* (Mendoza y col., 2008).

En este sentido, evidencias como: el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ que se observa tras el efecto de péptidos anfipáticos como melitina y su inhibición por antagonistas clásicos de canales de Ca^{2+} en eucariotas superiores como La^{3+} , Cd^{+2} y Ni^{+2} en *T. brucei* (Ruben y col., 1996); el hecho que este aumento pueda ser inducido por la liberación de ácido araquidónico (AA) vía fosfolipasa A (PLA_2) (Eintracht y col., 1998, Catisti y col., 2000); las evidencias de la existencia de la vía IP_3 -DAG, en diferentes Tripanosomatidios (Docampo y Pignataro 1991, Moreno y col., 1992a, Moreno y col 1992b; Moreno col., 1992, Ruben y Akins 1992); las evidencias sobre la activación de un posible receptor tipo L-glutamato en *T. cruzi* (Pavoteo y col., 1995); las evidencias sobre la existencia de un receptor nicotínico en *T. evansi* (Portillo y col., 2010) y las evidencias del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ como efecto a la adición en el medio de anticuerpos VSG en presencia de Ca^{2+} extracelular en *T. evansi* (Mendoza y Col., 2008), sugieren la posible existencia de canales de Ca^{2+} asociados a ligandos en tripanosomatidios. Por otra parte, el efecto de la Tg sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. evansi* en medio contentivo de Ca^{2+} sugiere la posible existencia de canales de Ca^{2+} asociados al vaciado de reservorio (Mendoza y col., 2002). Sin embargo, a pesar de las evidencias anteriores ningún canal ha sido caracterizado aun en los tripanosomatidios cuyos genomas han sido ya dilucidados (Moreno y Docampo, 2003).

Es importante mencionar que todos los sistemas involucrados en la homeostasis de Ca^{2+} en Tripanosomatidios han podido ser caracterizados, en la gran mayoría de los casos, gracias a la utilización de las mismas drogas que permitieron su caracterización en eucariotas superiores. Este hecho hace suponer que sistemas aun no identificados en estos parásitos, como el mecanismo de entrada del catión a través de la membrana plasmática, específicamente la entrada capacitativa, también podrá ser caracterizado con los inhibidores y agonistas que permitieron su caracterización en eucariotas superiores. Por ejemplo, con drogas como el 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB), la cual viene siendo utilizada desde finales de la década de los noventa como inhibidor de la entrada de Ca^{2+} a través de canales estimulados por el vaciado de reservorios intracelulares (Canales tipo SOC) (Bootman y col., 2002). Este compuesto podría esclarecer la presencia o no de este tipo de canales en respuesta a los resultados mostrados por Mendoza y colaboradores en 2002 con respecto al aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Tg en *T. evansi* enteros resuspendidos en medio libre de calcio y medio con 2mM Ca^{2+} .

A pesar de que estas evidencias fisiológicas, sugieren una similitud entre los mecanismos de entrada de Ca^{2+} en tripanosomatidios con respecto a los de eucariotas

superiores, aun es necesaria la confirmación de la existencia de dichos canales. Técnicas actuales de proteómica y biología molecular están contribuyendo enormemente en este campo, sugiriendo en los recientes genomas dilucidados de tripanosomatidios posibles proteínas putativas que compartan algún tipo de homología con las reportadas en eucariotes superiores. Por tal motivo, en este trabajo no proponemos contribuir en el estudio y caracterización de los posibles mecanismos de entrada de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*.

1.2.1.2. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, es un transportador expresado en la membrana plasmática de vertebrados e invertebrados. El intercambiador en conjunto con la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), exportan el Ca^{2+} hacia el exterior celular pero bajo condiciones especiales puede incorporar Ca^{2+} en paralelo con canales de Ca^{2+} (Blaustein y Lederer, 1999). La energía utilizada por este transportador para movilizar el Ca^{2+} así como la dirección de transporte del catión va a depender de los gradientes de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ a través de la membrana. En la gran mayoría de las células 3 Na^+ son intercambiados por un Ca^{2+} (Beauge y Dipolo, 2005). Sin embargo, en algunas células neuronales, el K^+ es transportado en la misma dirección que el Ca^{2+} con una estequiometría de 4 Na^+ por un Ca^{2+} y un K^+ .

La cinética del transportador es modulada por protones, Ca^{2+} , Na^{2+} y ATP entre otros (Blaustein y Lederer, 1999). En células excitables, el intercambiador juega un papel primordial en la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dada su alta tasa de trabajo. Sin embargo, dado a que la afinidad del transportador por el Ca^{2+} es 10 veces menor que la de bombas transportadoras dependientes de ATP como la PMCA (Carafoli, 1991), son estas últimas las responsables de las concentraciones basales y submicromolares del catión en la gran mayoría de las células.

1.2.1.2.1. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en tripanosomatidios

Evidencias apuntan a que este sistema transportador de Ca^{2+} no parece jugar ningún papel en el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} en los tripanosomatidios. La mayoría de los trabajos realizados no han podido identificar la presencia de esta proteína (sistema) en estos parásitos (Benaim y col 1993a, Zhang y col 1998).

1.2.1.3- Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA)

La Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA), fue descrita por primera vez en eritrocitos humanos, por Dunham y Glynn en 1961, pero no fue sino a partir del año 1966 cuando Schatzmann la relacionó con el bombeo de Ca^{2+} fuera de la célula (Schatzman, 1966; Carafoli, 1991; Brini y Carafoli., 2000). Esta enzima ha sido identificada en todas las células eucariotas estudiadas hasta el presente (Brini y Carafoli, 2009) y presenta propiedades estructurales y funcionales que la identifican y caracterizan diferenciándola de las demás ATPasas (Schatzmann, 1982; Carafoli y col., 1985; Garrahan y Rega, 1990).

Entre las principales características de la PMCA se pueden mencionar: un peso molecular que varía entre las diferentes isoformas de mamíferos, entre 60 y 150 KDa, un pH óptimo muy cercano al pH fisiológico celular, una alta especificidad por ATP muy superior a la de cualquier otro nucleótido, una elevada afinidad por el Ca^{2+} (0.1 –0.5 μM), su dependencia de Mg^{2+} y el hecho de pertenecer a la gran familia de ATPasas tipo "P", es decir aquellas enzimas que requieren de la fosforilación por ATP, y la formación de un intermediario fosforilado de alta energía en un residuo de ácido aspártico durante su ciclo de reacción (Carafoli y col., 1996).

La Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática está constituida por 10 segmentos transmembrana tipo α -hélices (M1-M10) quedando aproximadamente el 80% de la proteína expuesta hacia la cara citoplasmática de la célula (Fig.3). Entre los principales dominios citoplasmáticos de la PMCA cabe destacar: El dominio comprendido entre los dominios transmembrana M2 y M3, donde se encuentran los sitios de regulación de la enzima por parte de los fosfolípidos ácidos y el dominio comprendido entre la regiones transmembrana M4 y M5, el cual es el más prolongado de todos y posee la región catalítica de la enzima o los sitios activos de la bomba, es decir el ácido aspártico (D) donde ocurre la fosforilación por el ATP y el residuo de lisina (K) donde ocurre la unión del ATP (Carafoli, 1992). Esta región presenta una conformación tipo "bisagra" la cual está involucrada en los cambios conformacionales que permiten el acercamiento entre la región de fosforilación y la región de unión del ATP (Carafoli, 1992). Además, posee una región C-Terminal donde se encuentra el dominio de unión de la calmodulina (CaM), principal modulador proteico de la enzima. Este dominio es el que le permite a la PMCA diferenciarse de las demás ATPasa pues es donde se encuentran la mayoría de las regiones de regulación de la enzima, como son: uno de los sitios de regulación por fosfolípidos (Zvaritch y col., 1990), el sitio de fosforilación mediado por proteínas quinasas

dependiente de AMPc (James y col., 1989) y el sitio de fosforilación mediado por proteínas quinasas C (Wang y col., 1991) entre otras.

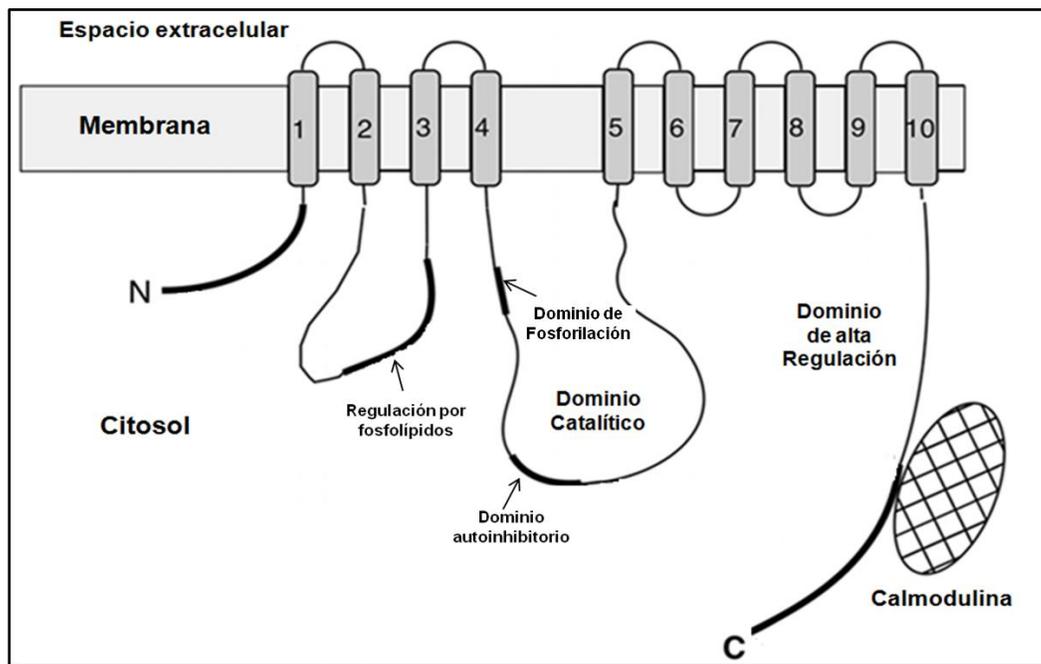


Figura.3. Modelo estructural de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática. Los rectángulos representados del 1 al 10 muestran las regiones transmembrana de la enzima. N y C dominio N-terminal y C-terminal respectivamente. Dominio catalítico (entre los dominios transmembrana M4 y M5). El esquema representa una PMCA estimulada por CaM la cual se une a la enzima hacia su extremo c-terminal. **Figura tomada y modificada de Strehler y col., 2007.**

1.2.1.3.1- Ciclo catalítico de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática

La característica principal de las ATPasas tipo "P", es la formación de un intermediario fosforilado estable en un residuo de Ac. aspártico (D), durante su ciclo catalítico y su sensibilidad a bajas concentraciones de vanadato (Benaim, 1993). Estudios realizados con espectroscopía de infrarrojo, determinaron que la proteína sufre cambios en su estructura secundaria observándose dos estados conformacionales intermedios (E_1 y E_2), en su ciclo de reacción (Fig.4).

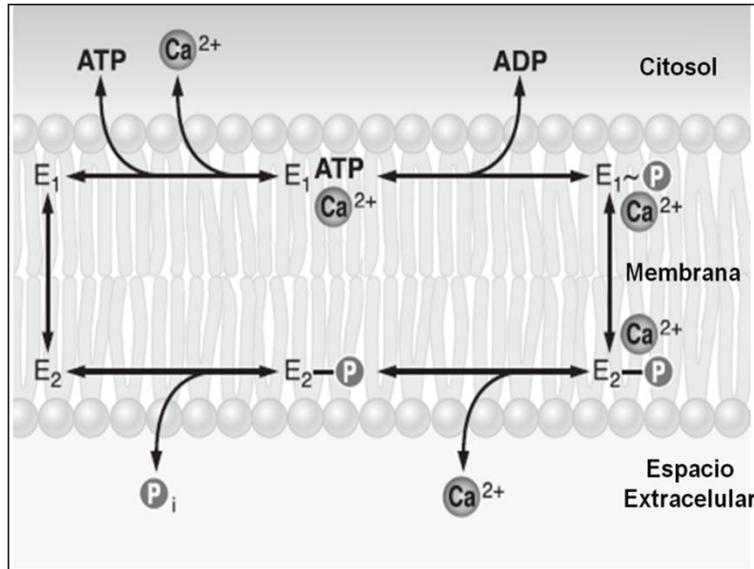


Figura.4. Ciclo catalítico de la PMCA. Donde E_1 y E_2 son las dos conformaciones de la enzima y $E_1 \sim P$ y $E_2 \sim P$ son las formas fosforiladas de la misma, de las cuales el conformero E_1 tiene un enlace de alta energía. La enzima en su conformación E_1 es fosforilada por ATP y enlaza Ca^{2+} . **Tomado y modificado de Brini y Carafoli, 2009.**

En la conformación E_1 , la Ca^{2+} -ATPasa enlaza Ca^{2+} en el lado citosólico de la célula con una alta afinidad y es también fosforilada por el ATP con alta afinidad formándose un intermediario fosforilado de alta energía $E_1 \sim P$. Este intermediario fosforilado es capaz de donar el grupo fosfato al ADP para sintetizar ATP, demostrándose así que este ciclo es reversible y que la síntesis neta de ATP ocurre aún en ausencia de gradiente de Ca^{2+} (Benaim y Meis, 1990). Posteriormente la fosfoenzima de alta energía sufre un cambio conformacional transformándose en una fosfoenzima de baja energía $E_2 \sim P$, es durante este cambio conformacional que el Ca^{2+} es transportado desde el interior al exterior celular ya que en la conformación $E_2 \sim P$ la enzima presenta una baja afinidad por el catión. Después de la translocación del catión el conformero $E_2 \sim P$ es desfosforilado a E_2 ocurriendo luego un nuevo cambio conformacional que conlleva a la reaparición de la enzima en la conformación E_1 completándose así el ciclo (Fig. 4) (Benaim, 1993 y Brini y Carafoli 2009).

Este ciclo de reacción responde en diversos sitios a la presencia de algunos efectores, como el Mg^{2+} el cual acelera la fosforilación y aumenta la afinidad por el ATP (Rega y Garrahan, 1975). La presencia de CaM, por su parte, también aumenta la velocidad máxima de reacción, acelerando tanto la fosforilación de la enzima como su

desfosforilación manteniendo constante el nivel del intermediario fosforilado e incrementando la afinidad de la enzima por el Ca^{2+} y por el ATP. Por otra parte, el vanadato inhibe la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática así como la de todas las ATPasas del tipo P. Este inhibidor ejerce su efecto sobre la enzima sustituyendo el fosfato en el sitio activo y estabilizando, de esta manera, la conformación E_2 evitando así que se complete el ciclo catalítico (Benaim y col., 1994).

1.2.1.3.2. Isoformas de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática

En mamíferos, 4 genes independientes identificados como ATP2B1-4, codifican para las 4 isoformas principales de la PMCA. Las posibles 30 variantes adicionales de la enzima (tabla 2), son generadas como consecuencia de procesamientos alternativos de los diferentes RNA mensajero del transcrito primario de dichas isoformas (Strehler y Zacharias, 2001; Strehler y col., 2007 y Brandenburger y col., 2010). La tabla 3, muestra las isoformas mayoritariamente expresadas así como los anticuerpos específicos que permiten su caracterización.

Tabla 2. Isoformas alternativas de PMCA y sus nomenclaturas más comunes

(Strehler y Zacharias, 2001)

Isoforma	Zona de procesamiento	Nomenclatura Original	Nomenclatura Alternativa
PMCA1	A	x^*	AII*
	B	$-^{\dagger}$	(BI) †
	B	$-^{\dagger}$	(BII) †
	C	a	CII
	C	b	CI
	C	c	CIII
	C	d	CIV
PMCA2	C	e	CV
	A	w	AIII
	A	x	AII
	A	y	AIV
	A	z	AI
	C	a	CII
PMCA3	C	b	CI
	C	c	CIII
	C	d	CIV
	C	e	CV
	C	f	CVI
	A	x	AII
	A	z	AI
PMCA4	B	$(g)^{\dagger}$	(BI) †
	B	$-^{\dagger}$	(BII) †
	C	a	CII
	C	b	CI

*Esta zona de procesamiento alternativo no genera ningún producto para PMCA1. †El procesamiento alternativo en la zona B, sólo ha sido evidenciado en algunos tejidos intestinales.

Tabla 3. Isoformas de PMCA de mayor expresión y sus anticuerpos específicos

(Strehler y Treiman, 2004 y Carafoli y Stauffer, 1993)

Gen humano/Isoforma/locus cromosoma	Variante más común	Número de aa	Número del Gen Bank	Anticuerpos Específicos
ATP2B1 PMCA1 12q21-q23	PMCA1x/a PMCA1x/b	1176 1220	U15686 J04027 NM_001682	5F10 [†] NR1 [#] , 1N [#] CR1A CRXB ^{\$}
ATP2B2 PMCA2 3q25-p26	PMCA2w/a PMCA2x/a PMCA2z/a PMCA2w/b PMCA2x/b PMCA2z/b	1199 1168 1154 1243 1212 1198	U15688 X63575 NM_001683	5F10 ^{††} NR2 [#] , 2N [#] CR2A CRXB ^{\$}
ATP2B3 PMCA3 Xq28	PMCA3 x/a PMCA3z/a PMCA3x/b PMCA3z/b	1173 1159 1220 1206	U57971 NM_021949 U60414	5F10 ^{††} NR3 [#] , 3N [#] CR3A CR3B CRXB ^{\$}
ATP2B4 PMCA4 1q25-q32	PMCA4x/a PMCA4z/a PMCA4x/b PMCA4z/b	1170 1158 1205 1193	M83363 M25974 NM_001684	5F10 ^{††} JA9/NR4 [#] , 4N [#] CR4A ^{##} JA3 ^{\$\$}

*Secuencia del exón de la zona de procesamiento C. **Anticuerpo no selectivo para isoformas. #Anticuerpo selectivo para isoforma pero no para variantes alternativas. ## Anticuerpo específico para PMCA4a de rata. \$ Anticuerpo que reconoce PMCA1b, 2b y 3b. \$\$Anticuerpo específico para PMCA4b de humanos.

Shull y Greeb en 1988, fueron los primeros en proponer que cada uno de los transcritos primarios de cada una de las isoformas de la enzima, podrían estar sujetas a procesamientos alternativos, explicando con esto la existencia de más de cuatro tipos de PMCA en humanos. Este hecho fue evidenciado un año más tarde por Strehler y colaboradores quienes demostraron la existencia de isoformas alternativas de la PMCA1 (Strehler y col., 1989). En este trabajo, los autores proponen la existencia de varios sitios de procesamiento en la PMCA que afectan exclusivamente tres regiones de la enzima, uno cercano a uno de los dominios de regulación por fosfolípidos, en el primer dominio intracelular conocido como zona de procesamiento alternativo A, otro ubicado entre los dominios transmembrana nueve y diez conocido como zona B, cuya existencia actualmente es discutida y el último en la región de regulación del extremo C-terminal de la enzima, conocido como zona de procesamiento alternativo C.

1.2.1.3.3. Mecanismos de Modulación de la Ca²⁺-ATPasa

La característica más importante de la PMCA y que la diferencia de las demás bombas tipo "P" es la multiplicidad de regulación a la cual es sensible, lo que refleja la importancia de la bomba en el mantenimiento de los niveles intracelulares del Ca^{2+} .

Modulación por la calmodulina (CaM)

La CaM, es una proteína ácida enlazadora de Ca^{2+} , altamente conservada, presente en todas las células eucariotas. Su estructura terciaria está constituida por dos regiones globulares en los extremos carboxi y amino terminal, unidos por una larga α hélice flexible. La unión de Ca^{2+} a la CaM (activación alostérica) induce cambios conformacionales exponiendo en la proteína dominios hidrofóbicos que le permiten unirse de esa manera a sus proteínas dianas en las células, alterando su conformación, actividad y función. Entre las proteínas blanco reguladas por el complejo Ca^{2+} /CaM, se encuentran las PMCA.

La unión de CaM a la Ca^{2+} -ATPasa aumenta la velocidad máxima de la enzima y disminuye, en un orden de magnitud, el K_m para el Ca^{2+} (Jarrett y Penniston, 1977; Gopinath y Vincenzi, 1977). La interacción entre la enzima y la CaM depende del nivel de Ca^{2+} (Foder y Scharff, 1981) y algunas isoformas tienen mayor afinidad por la CaM que otras, por ejemplo la hepática (Kessler y col., 1990) y la isoforma PMCA2 (Hilfiker y col., 1994). El mecanismo de estimulación de la Ca^{2+} -ATPasa por la CaM ha sido bien establecido (Wuytack y Raeymaekers, 1992; Carafoli, 1991, Benaim, 1993) e involucra un dominio definido como autoinhibitorio de aproximadamente 9 KDa que se encuentra localizado en el extremo carboxilo terminal de la enzima y que interactúa con dos regiones que se encuentran ubicadas en los dominios citoplasmático cerca de los sitios de unión y fosforilación por ATP (Benaim y col., 1984; Benaim y col., 1986, Sarkadi y col., 1986, Vorherr y col., 1991). Durante el cambio conformacional generado por la unión de la CaM a la PMCA, este dominio es alejado del sitio activo de la enzima, lo cual permite un mayor acceso de los sustratos al mismo.

La localización del dominio de unión de CaM en la PMCA y la evidencia de un dominio autoinhibitorio, se determinó en un primer acercamiento mediante estudios de proteólisis. Demostrándose que el dominio de unión de CaM en la PMCA está ubicado cerca del extremo C-terminal de la enzima, ya que una activación similar a la obtenida por CaM es originada cuando se somete a la bomba a proteólisis controlada en dicha región, removiéndose aproximadamente un cuarto de la enzima (Enyedi y col. 1980; Niggli y col., 1981).

Adamo y colaboradores en 1992, lograron establecer una región de 28 residuos de aminoácidos ubicada en el extremo C-terminal de la enzima, como la responsable de la afinidad de la proteína por CaM. La ubicación del dominio de interacción de CaM con la proteína pudo determinarse mediante el uso de formas truncadas de la enzima (Adamo y col., 1992b; Enyedi y col., 1993; Verma y col., 1994). La estandarización del sistema de expresión de proteínas en células COS, para la expresión de las diferentes isoformas de la enzima así como para formas truncadas de éstas, ha sido clave en el estudio y caracterización de la PMCA.

La existencia de un dominio autoinhibitorio en la PMCA en ausencia de CaM fue confirmado por Flachetto y colaboradores en 1991, quienes lograron identificar dos sitios citoplasmáticos de la enzima donde interactúa el dominio de unión de la CaM (Falchetto y col., 1991 y Falchetto y col., 1992). La incubación de la PMCA previamente tratada con calpaina, es decir con ausencia de su dominio de unión a CaM, con péptidos conteniendo la misma secuencia del dominio de unión a CaM marcados radiactivamente, demostraron la existencia de dos sitios de interacción sobre el resto de la enzima. El primero de estos sitios se encuentra ubicado en el segundo dominio citosólico entre el dominio donde se da la formación del intermediario fosforilado y el de unión de nucleótidos, este sitio de unión a CaM comprende 8 residuos aminoácidos (residuos 537 al 544) y su interacción con el dominio de unión a CaM puede perturbar la unión de ATP o la formación del intermediario fosforilado reflejándose en una actividad enzimática menor a la observada en presencia de CaM, correspondiendo a la actividad basal de la enzima (Strehler y Treiman, 2004). El segundo sitio de interacción fue localizado en el primer gran dominio citosólico entre los residuos aminoácidos 206 y 271, dominio involucrado activamente en el acoplamiento de la hidrólisis de ATP y el transporte de Ca^{2+} (Brandl y col., 1986). La interacción del dominio de unión de CaM con estos dos sitios dentro de la misma proteína sugiere que durante el ciclo catalítico debe haber una movilidad de ambos dominios para permitir dicho acoplamiento.

Modulación por proteínas quinasa A y C

La Ca^{2+} -ATPasa también puede ser estimulada por la fosforilación directa a través de proteínas quinasas como la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la proteína quinasa C (PKC). Esta fosforilación, sobre la enzima, se da en una región cercana al dominio en el cual se une CaM, en el último dominio transmembrana hacia la región C-terminal de la enzima. La proteína quinasa dependiente de AMPc induce, sobre la Ca^{2+} -ATPasa, un aumento tanto de la velocidad máxima como de la afinidad de la enzima por

el Ca^{2+} . Por su parte, la PKC sólo incrementa la velocidad máxima de la enzima sin afectar su K_m por el Ca^{2+} (Smallwood y col., 1988; James y col., 1989), pero en ambos casos dicha estimulación es inferior a la inducida por CaM.

La actividad de la PKA sobre la Ca^{2+} -ATPasa es aditiva a la actividad que induce la CaM en la misma, mientras que la de la PKC es competitiva con CaM, dependiendo esto último del tipo de isoforma de PKC (Wang y col., 1991). Pero la fosforilación y activación de la Ca^{2+} -ATPasa por PKC ha sido producto de mucha discusión, mientras unos investigadores como Smallwood y col., en 1988 proponen que la PKC estimula la actividad de la bomba y que además es aditiva a CaM. Otros como Wang y colaboradores en 1991 demuestran que los efectos de CaM y PKC son excluyentes, pues la fosforilación de la Ca^{2+} -ATPasa por parte de la PKC ocurre en el dominio C-terminal de la enzima, específicamente en un dominio de 12 KDa ubicado en el sitio de unión de CaM a la Ca^{2+} -ATPasa. Enyedi y colaboradores en 1996 proponen que la diferencia entre los resultados de estos investigadores se debe a la gran variedad de isoformas de la Ca^{2+} -ATPasa, las cuales pueden responder de manera diferencial a la fosforilación y también a la gran variedad de isoformas de PKC. Agnes estudiando la isoforma 4b de la Ca^{2+} -ATPasa corrobora el efecto excluyente entre la actividad que ejerce la CaM sobre la enzima y la ejercida por PKC. Los estudios realizados por Hofmann y colaboradores en 1994 también evidencian que la fosforilación de la Ca^{2+} -ATPasa por parte de la PKC es notablemente reducida por CaM.

Modulación por solventes orgánicos

La PMCA puede ser regulada además, por solventes orgánicos como el dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol y etilenglicol (EG) (Benaim y de Meis, 1990). Estos efectores a diferencia de los antes mencionados, estimulan la enzima a niveles superiores que los inducidos por CaM, la cual ha sido considerada a través de los años como el mayor estimulador de la bomba.

Se ha demostrado, que la sustitución de cierta proporción de agua presente en el medio que rodea la enzima por solventes orgánicos como DMSO, glicerol, EG y polietilenglicol (PEG) conlleva a una estimulación tanto a nivel de V_{max} (Benaim y de Meis, 1989 y Benaim y col., 1990) como en la afinidad de la enzima por el Ca^{2+} (Benaim, 1990). Por su parte, el DMSO simula el efecto de CaM tanto en el incremento de V_{max} como en la disminución del K_m por el Ca^{2+} (Benaim, 1990). Los polialcoholes como el EG,

el glicerol y el PEG ejercen un efecto estimulador superior sobre la PMCA que el DMSO (Benaim y de Meis, 1989).

La similitud entre la estimulación conferida por CaM y los solventes orgánicos como el DMSO, sugiere mecanismos de acción similares para ambos efectores (Benaim, 1992 y Benaim, 1993). Debido a que la interacción de CaM con el dominio regulatorio en la enzima es del tipo hidrofóbico (Klee y col., 1982 y James y col., 1988), es lógico suponer que la interacción del dominio regulatorio de la enzima con los solventes orgánicos sea producto de la propiedad de estos solventes de reducir el grado de organización del medio acuoso (Dupont y Pougeois, 1983), lo cual permitiría la relajación de dicho dominio disminuyendo así la restricción impuesta por el mismo, simulando así el efecto de CaM.

Modulación por el etanol

En 1994, Benaim y colaboradores, demostraron que el etanol tiene un efecto estimulador sobre la Ca^{2+} -ATPasa purificada de eritrocitos humanos, encontrándose que a una concentración de 5% etanol, la velocidad máxima de la enzima aumenta 2.4 veces con respecto a la actividad basal produciéndose además una disminución del K_m para el Ca^{2+} . Por otra parte Benaim y colaboradores demostraron que cuando el etanol y la CaM se encuentran presentes de manera simultánea, el efecto estimulador de ambos moduladores es aditivo, encontrándose un incremento de 3.4 veces en la V_{max} con respecto al control. Adicionalmente, demostraron que el etanol estimula a la enzima luego de que ésta ha sido previamente activada mediante proteólisis parcial con tripsina, la cual remueve la región que enlaza a la CaM (región autoinhibitoria). Proponiéndose de esta manera, que la región y el mecanismo de estimulación del etanol pudieran ser diferentes a los de CaM.

Por otra parte, la presencia del etanol también incrementa el transporte del Ca^{2+} , en vesículas invertidas (IOVs) de eritrocitos humanos. El efecto estimulador de los alcoholes depende de la longitud de la cadena del alcohol, siendo menor la concentración del alcohol necesaria para alcanzar el máximo efecto estimulador, a medida que aumenta el número de átomos de carbono (Benaim y col., 1994). La importancia de este trabajo fue el obtener evidencias que postularan una posible estimulación directa de la enzima por el alcohol y no a través de su posible efecto sobre el orden de los lípidos de membrana; debido a que el efecto es el mismo, tanto en la enzima purificada como en la

enzima en su membrana original, es decir, en fantasmas de eritrocitos humanos. Asimismo, se demostró que la enzima podría trabajar a una mayor velocidad que la que había sido reportada hasta ese momento como máxima en presencia de CaM, con las importantes implicaciones fisiológicas que esto representa, al ser esta enzima clave en el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} .

Por otra parte, Cervino y colaboradores en 1998 demostraron que las distintas isoformas de la enzima tienen una sensibilidad diferencial con respecto al etanol y que en la isoforma presente en cerebro (PMCA2), el máximo efecto estimulador es obtenido a una concentración menor de etanol. De hecho, a concentraciones farmacológicas de 0.5 % se encuentra el óptimo en el caso de la isoforma (PMCA2) de cerebro, en contraste con las isoformas de membrana plasmática de eritrocitos humanos (PMCA1 y PMCA4), cuyo máximo efecto estimulador fue observado a una concentración de etanol entre 1 y 5%. Tales ensayos fueron realizados en sistemas en los que las proteínas fueron expresadas a partir del gen de la enzima y confirman la mayor sensibilidad de los tejidos cerebrales al etanol. En este mismo trabajo y mediante el uso de formas truncadas de la enzima, se determinó la existencia de una región localizada en el dominio C-terminal de la bomba de Ca^{2+} , con una extensión de aproximadamente 95 aminoácidos, cuya remoción elimina la sensibilidad al etanol por parte de la enzima. Todo esto apunta a la importancia de esta activación, y a lo pertinente de dilucidar los mecanismos de activación por este alcohol y por moléculas con regiones estructurales similares las cuales pudieran actuar como moduladores fisiológicos de la enzima.

Cervino y colaboradores en 1998, demostraron que el etanol tiene un efecto estimulador diferencial en las distintas isoformas expresadas de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, corroborándose así un efecto de este alcohol directamente sobre la proteína, de aquí que resulte interesante seguir los estudios que permitan identificar la posible región de interacción de este alcohol con la enzima.

Modulación por Lípidos

La Ca^{2+} -ATPasa es activada por fosfolípidos ácidos como la fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) así como por ácidos grasos polinsaturados de cadena larga como ácido oleico y AA, en ausencia de CaM (Ronner y col., 1977; Niggli y col., 1981; Sujú y col., 1996). Se ha sugerido que la presencia de este tipo de fosfolípidos en el ambiente natural de la enzima, podría traer como consecuencia el que la enzima se encuentre

estimulada hasta un 50 % de su estimulación máxima en condiciones naturales (Carafoli, 1992).

La estimulación de la enzima por los fosfolípidos ácidos depende en la generalidad de los casos, de la carga de los mismos a pH fisiológico. Así, mientras más cargas negativas contengan la molécula, mayor es la estimulación (Missiaen y col., 1989). La importancia del número de cargas negativas se ha establecido directamente, mediante el uso de medidas de fluorescencia que indican la transferencia de energía entre los fosfoinosítidos y la ATPasa (Verbist y col., 1991). De hecho, Choquette y colaboradores en 1984 encontraron que el fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂) disminuye la concentración media de Ca²⁺ necesaria para activar la enzima, aún más que la CaM, considerando así que los fosfatidilinosítoles son los activadores más fuertes, entre todos los lípidos de membrana involucrados en la modulación de la enzima. La estimulación se produce en dos pasos de activación cuando los fosfolípidos tienen carga negativa y es esencialmente independiente del tipo de ácidos grasos que constituyen al fosfolípido (Lehotsky y col., 1992).

Además, la estimulación depende de la unión directa de los lípidos a la proteína. Los estudios de Filoteo y colaboradores en 1992 y de Brodin y colaboradores en 1992, demostraron la existencia de dos sitios de unión de los fosfolípidos con la enzima. Uno de estos sitios es compartido con la CaM y el otro es un dominio proteico separado, descrito por Zvaritch y colaboradores en 1990, rico en lisina y localizado en el dominio citoplasmático ubicado entre los dominios transmembrana 2 y 3 (Fig.3). Estudios más recientes han determinado la región comprendida entre los aa 296 y 349 como la responsable del efecto estimulador por parte de fosfolípidos ácidos descrita por Zvaritch y colaboradores (Tezanos Pinto y Adamo, 2002).

Respecto al mecanismo exacto de acción de los fosfolípidos ácidos sobre la ATPasa, sólo existe información bien fragmentaria. Como ya se ha mencionado, las medidas de dicroísmo circular y de fluorescencia, indican que la fosfatidilserina induce un cambio en el contenido helicoidal de la ATPasa, reduciéndolo de 66% a 61% en el conformero *E*₁, de modo que parte de la estimulación podría ser consecuencia de dicho cambio conformacional (Wrzosek y col., 1989). Los distintos fosfolípidos ácidos probablemente afectan los diferentes pasos elementales de las reacciones en el ciclo catalítico. De hecho, se sabe que el nivel del intermediario fosforilado de la PMCA en eritrocitos de porcino no es afectado por fosfatidilserina (20%), pero aumenta 1.6 veces en

presencia de fosfatidilinositol 4-fosfato. A la inversa, la fosfatidilserina, aumenta la actividad *p*-nitrofenil fosfatasa de la bomba de Ca^{2+} , mientras que el fosfatidil inositol 4-fosfato no tiene efecto significativo. Esto sugiere que algunos lípidos aceleran principalmente la fosforilación, mientras que otros aceleran la desfosforilación (Lehotsky y col., 1992).

Por otra parte, de los trabajos de Vrolix y colaboradores en 1988, quedó claramente establecido que aún en la presencia de fosfatidilserina, el fosfatidil inositol 4-fosfato induce una estimulación adicional de la ATPasa. Esta observación también es compatible con un modelo donde coexisten distintos sitios de unión para lípidos en la ATPasa.

Aparentemente, estos sitios de interacción son sensibles a la carga sustentada por las moléculas. De hecho, los residuos de arginina pudieran estar involucrados en la mediación del efecto del fosfolípido. El fenilgloxal, un reactivo que inhibe la PMCA de eritrocito y de músculo liso (Raess y col., 1985; Missiaen y col., 1989), en forma dependiente del tiempo, disminuye la V_{max} de la curva de activación por Ca^{2+} . La presencia de bajas concentraciones de fosfatidilinositol, fosfatidilinositol mono y bis-fosfato y de ácido fosfátidico previene parcialmente esta inactivación.

También es importante resaltar que, al comparar la estimulación inducida por CaM con la inducida por los fosfolípidos, se encuentra que las concentraciones de CaM y de fosfolípidos necesarias para producir la estimulación de la enzima son dramáticamente diferentes. La estimulación por fosfolípidos requiere cientos de moléculas por molécula de la PMCA. Aún así, son más efectivos que la CaM, ya que disminuyen el K_m a valores menores que los que se logran con CaM (Enyedi y col., 1987) y su efecto se mantiene, aún cuando se someta a digestión enzimática parcial a la ATPasa y se le remueva el extremo C-terminal con los dominios de unión de CaM y de fosforilación dependiente de AMPc.

Los trabajos hasta ahora discutidos han permitido sugerir que los mecanismos de estimulación por CaM y por los fosfolípidos ácidos podrían ser similares, lo cual ha sido apoyado por los hallazgos de que ambos agentes moduladores disminuyen el contenido de α -hélice de la PMCA (Wrzosek y col., 1989). Sin embargo, existen abundantes diferencias entre ambos moduladores, como son, el número de sitios de unión, la cantidad de moléculas necesarias para producir la estimulación y el nivel final de estimulación.

Sujú y colaboradores en 1996, demostraron que los fosfatidilalcoholes, con el grupo hidroxilo esterificado en la cabeza, producen un efecto similar al que se encuentra con otros fosfolípidos ácidos. Sin embargo, dichos lípidos, le confieren a la enzima una mayor disminución del K_m por el ión, cuando se encuentran en presencia de CaM, lo que implica la existencia de mecanismos de estimulación que probablemente involucren a sitios diferentes en la PMCA, para los fosfolípidos y para la CaM. Además, el etanol, tanto en la enzima purificada como “in situ” presenta un efecto aditivo sobre la acción del fosfatidiletanol y sus homólogos, tanto sobre la afinidad por el calcio, como sobre la actividad máxima de la enzima (Sujú y col., 1996).

El fosfatidiletanol, se forma en altas concentraciones en tejidos como el cerebro, como consecuencia de la actividad de la fosfolipasa D (Gustavsson y Alling, 1987; Kobayashi y Kanfer, 1987); donde se conoce que estimula a la proteína quinasa C (PKC), con el consiguiente efecto en el resto de la cascada de transducción de señales (Asaoka y col., 1988).

La formación del fosfatidiletanol se produce cuando la transfosfatidilación mediada por la fosfolipasa D ocurre en presencia de etanol, el cual se asocia al lípido en lugar de una molécula de agua (Gustavsson y Alling, 1987). Esta fosfolipasa, es estimulada por el etanol, con aumento en la producción de fosfatidiletanol (Hoek y col., 1987). Es de hacer notar, que dicho lípido incrementa la actividad de la PMCA sólo o en presencia de etanol, junto al cual tiene un efecto aditivo de estimulación sobre la actividad de la enzima, apuntando de esta manera a la existencia de múltiples sitios de estimulación en la bomba (Sujú y col., 1996). Este lípido adquirió relevancia fisiológica, cuando se observó que su concentración incrementa durante la ingesta de etanol, y se le ha considerado como uno de los responsables del efecto farmacológico del etanol sobre las células (Alling y col., 1984; Mueller y col., 1988).

Colina y colaboradores en el 2002, trabajando con esfingolípidos, demostraron la estimulación e inhibición diferencial sobre la PMCA que presentan lípidos que poseen la característica de tener expuesto o no un grupo hidroxilo libre en la región polar de la molécula. Los lípidos que fueron ensayados en este trabajo incluyeron a la esfingomielina, la esfingosina y la ceramida, así como ceramida -1-P y esfingosina -1-P. Todos estos esfingolípidos han adquirido notoriedad por su participación en procesos de señalización celular, en particular en los fenómenos de apoptosis, diferenciación celular, etc. Siendo los más relevantes, la ceramida y la esfingosina. La cerámida, es un

esfingolípido que se produce como consecuencia de la acción de la esfingomielinasa (una fosfolipasa) sobre la esfingomielina, por su parte la esfingosina, es producto de la digestión de la ceramida por parte de una ceramidasa, enzima que escinde el enlace amida presente en el precursor (Fig.5).

La ceramida tiene un notable efecto estimulador sobre la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, el cual es aditivo con el efecto de CaM y de etanol, así como la de ambos moduladores en conjunto, mientras que la presencia de un grupo fosfato (ceramida-1-P) que bloquee al grupo hidroxilo libre, elimina la activación. Por otra parte, la esfingosina, que también tiene un grupo hidroxilo libre, presenta un efecto inhibitorio que también desaparece cuando se fosforila el grupo hidroxilo. Probablemente la cadena hidrocarbonada, que se escinde para formar la esfingosina, tenga relación con el efecto estimulador de la cerámida (Colina y col., 2002). La esfingomielina por otra parte, molécula de la cual se originan las dos anteriores por sucesivas hidrólisis y que carece de grupos hidroxilos libres, no tiene efecto sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa.

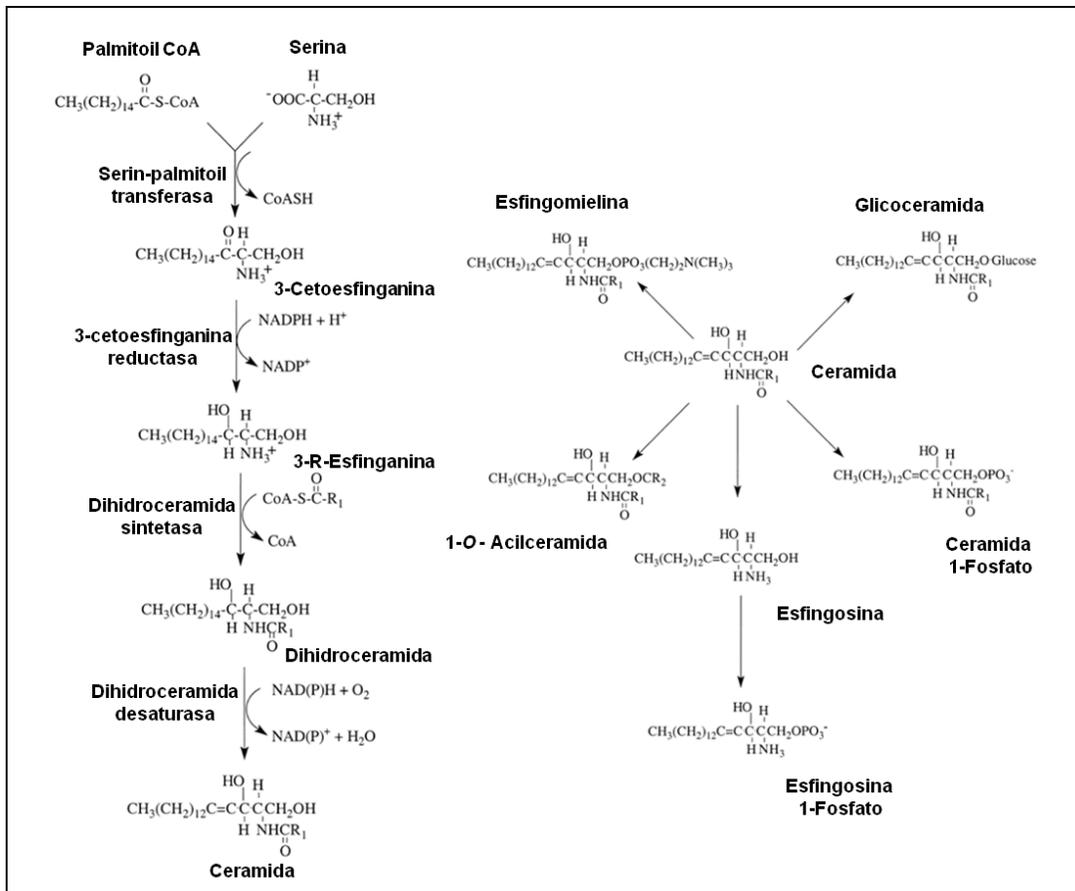


Fig. 5. Síntesis de esfingolípidos. Esquema que sintetiza la síntesis de esfingolípidos y las enzimas involucradas en dicho proceso. Figura modificada de (Shayman, 2000).

Todos estos resultados son de gran importancia, puesto que abren una puerta al estudio de la regulación a través de esfingolípidos sobre la bomba de calcio. Todas las evidencias planteadas, tomadas en conjunto, reflejan además la importancia del grupo hidroxilo en la cabeza de los lípidos en la modulación de la actividad de la enzima. Sin dejar de lado la gran relevancia que estos segundos mensajeros podrían tener al ejercer papeles antagónicos sobre la enzima, los cuales pudieran conducir a distintos niveles de activación de la misma según las necesidades particulares de la célula en respuesta a algunas señales extracelulares. El etanol, entonces, pudiera ser un efector que comparte una de las regiones activas en la modulación, con estos fosfolípidos. Por esta razón, resulta de gran interés determinar la posible relación de la región de interacción del etanol con los posibles sitios de interacción de estos segundos mensajeros con la enzima, así como el tratar de dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos sobre la misma.

Modulación por Diacilglicerol

Por otra parte, trabajos realizados en nuestro laboratorio por Winkler y col. en 1998 han determinado el efecto que, sobre la enzima purificada, tienen lípidos con grupos “hidroxilos” libres como el fosfatidiletanolglicol, un fosfolípido sintético (PEG), y el diacilglicerol (DAG). Este último participa como importante segundo mensajero producido por la acción de la fosfolipasa C sobre el fosfolípido de membrana, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), el cual es un componente minoritario de la membrana plasmática localizado en la monocapa interna. Un gran número de hormonas y factores de crecimiento estimulan la hidrólisis del PIP_2 por parte de la fosfolipasa C, reacción que produce dos importantes segundos mensajeros el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y el DAG, los cuales activan diferentes rutas de señalización que involucran la movilización de Ca^{2+} , ya sea vía activación de la proteína quinasa C (DAG) o movilización del Ca^{2+} desde reservorios intracelulares (IP_3).

Winkler y colaboradores en 1998 y más recientemente Pérez-Gordones y colaboradores en el 2009 dirigieron su investigación hacia la búsqueda de un compuesto fisiológico que actuara sobre la Ca^{2+} -ATPasa simulando al etanol (Benaim y col., 1994) y corroborar así la importancia del grupo hidroxilo (OH) libre en dicho efecto. Los autores demostraron que tanto el PEG como el DAG estimulan directamente la bomba, aumentando la velocidad máxima y disminuyendo el K_m para el Ca^{2+} , encontrándose además que para el DAG, existía una aditividad del efecto con CaM y etanol. El diacilglicerol estimula tanto la enzima purificada como el transporte de calcio en vesículas invertidas de eritrocitos humanos, estableciéndose así el modelo planteado en la figura 6. El que el efecto del DAG sea aditivo con el EtOH, no permite considerarlo como su sustituyente fisiológico, pero abre un nuevo camino en el conocimiento de la modulación fisiológica de esta importante enzima. Por esta razón, es interesante también establecer el posible sitio de interacción de este segundo mensajero con la enzima para que al igual que con los esfingolípidos antes mencionados, podamos ahondar en el mecanismo de acción de éste compuesto sobre la misma.

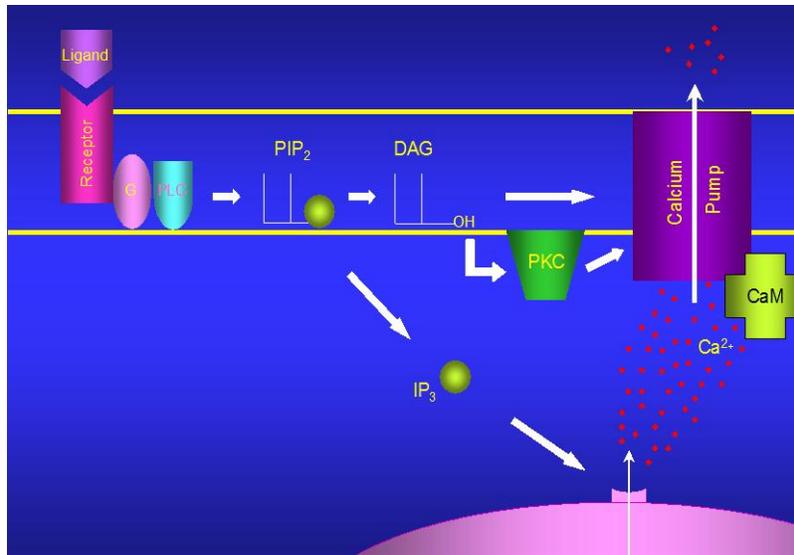


Fig. 6. Modelo de la regulación de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática por el DAG. PLC: fosfolipasa C; IP_3 : inositol trifosfato; PKC: proteína quinasa C; DAG: diacilglicerol; PIP_2 : fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato; CaM: calmodulina; G: proteína G. La figura muestra la propuesta de Winkler y colaboradores en 1998 de lo que ocurre cuando un estímulo alcanza a un receptor celular, el cual se inicia con una cascada de eventos que produce la activación de la fosfolipasa C, la cual a partir de PIP_2 genera IP_3 y DAG. El DAG producido activa tanto a la PKC como directamente a la Ca^{2+} -ATPasa. La PKC activada también fosforila a la Ca^{2+} -ATPasa de forma directa.

1.2.1.3.4. PMCA en Tripanosomatidios

La presencia de una Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA, ha sido demostrada mediante métodos bioquímicos (medición de su actividad en membranas plasmática de parásitos) y métodos inmunológicos (reconocimiento por anticuerpos comerciales dirigidos contra PMCA de eucariotas superiores) en todos los tripanosomatidios estudiados (Benaim y Romero, 1990, Benaim y col., 1991, Benaim y col., 1993a, Benaim y col., 1993b, Benaim y col., 1995). A pesar de que actualmente existen evidencias moleculares que sugieren la existencia de posibles PMCA en tripanosomatidios (Luo y col., 2004), los primeros estudios de caracterización de esta enzima en estos eucariotas inferiores fueron bastante controversiales. Se cree que el motivo de tales controversias fue debido a que la mayoría de los autores no utilizaron fracciones enriquecidas en membrana plasmática de estos parásitos y además a la presencia en los mismos de una actividad Mg^{2+} -ATPasa muy alta, la cual la mayoría de las veces enmascaraba la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa. Por otra parte, Benaim y Romero en 1990 mediante la utilización de una metodología que permitía la obtención de fracciones enriquecidas en membrana plasmática de estos parásitos

podieron demostrar la existencia de una PMCA dependiente de Mg^{2+} y estimulada por CaM en promastigotes de *L. braziliensis*. Posteriormente la enzima fue descrita en *T. cruzi* (Benaim y col., 1991), *T. brucei* (Benaim y col., 1993) y en *L. mexicana* (Benaim y Cervino, 2000).

Todas estas bombas descritas en tripanosomatidios, al igual que el resto de las PMCA's descritas hasta el momento, son reguladas por CaM. Esta proteína incrementa la constante de afinidad de la enzima por el Ca^{2+} y su velocidad máxima. La purificación de esta enzima en *T. cruzi*, mediante una columna de afinidad de CaM-sefarosa, permitió caracterizarla como una proteína de 140 kDa, similar a la PMCA de eucariotas superiores (Benaim y col., 1995). A pesar de la existencia de ensayos de actividad donde se confirma el efecto estimulador inducido por la CaM, sin contar que la enzima de *T. cruzi* fue purificada por un método que sugiere su interacción directa con la CaM, la reciente dilucidación de los genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y la clonación y secuenciación de una posible PMCA descrita en *T. brucei* (Luo y col., 2004) sugieren la ausencia de un dominio clásico de unión a calmodulina. Esta controversia generada entre el efecto estimulador de CaM y la aparente falta de un dominio clásico de unión de la CaM sobre las posibles PMCA's de tripanosomatidios caracterizadas molecularmente, sugiere la necesidad de profundizar en el tema, indagándose un poco más en la posibilidad de dominios alternativos de unión a CaM en la enzima de estos tripanosomatidios, lo cual podría respaldar el efecto observado con respecto a esta proteína.

1.2.2. Sistemas de transporte intracelulares de Ca^{2+}

En eucariotas superiores, se han caracterizado varios sistemas intracelulares que participan en la homeostasis de Ca^{2+} , destacándose el sistema presente a nivel de retículo endoplasmático y el sistema presente a nivel de la mitocondria (Brini y Carafoli 2000). Por su parte, en los tripanosomatidios se ha descrito la presencia de 3 sistemas de transporte de Ca^{2+} a nivel intracelular, como lo son: el sistema de transporte mitocondrial, el sistema de transporte a nivel de retículo endoplasmático y el sistema de transporte a nivel de los acidocalcisomas.

1.2.2.1- Sistemas de transporte de Ca^{2+} en el Retículo endoplasmático

El RE, puede considerarse uno de los principales organelos que participa en la homeostasis del Ca^{2+} . La concentración interna del Ca^{2+} dentro del RE es similar a la

concentración extracelular (1mM) (Rottingen y Iversen, 2000), generando un gran gradiente entre el organelo y el citoplasma. El balance que mantiene este gradiente, está a cargo de una proteína de la familia de las ATPasas (SERCA como mecanismo de incorporación del Ca^{2+} al RE) y canales de calcio ligando sensibles (receptor de IP3 y receptor de rianodina, como mecanismo de liberación) (Carafoli y col, 2001).

1.2.2.1.1. Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplasmático (SERCA)

SERCA, fue la primer proteína transportadora de Ca^{2+} dependiente de ATP descubierta (entre 1961 y 1962) (Brini y Carafoli, 2009). SERCA al igual que la PMCA, es una proteína perteneciente a la familia de las ATPasas tipo P, por lo que durante su ciclo catalítico forma un intermediario fosforilado en un residuo de ácido aspártico. (Fig.4) (Brini y Carafoli, 2000).

Las tres isoformas de la enzima (SERCA 1, 2 y 3), las cuales comparten entre un 75 a 85% de homología entre sí, son codificadas por tres genes independientes (Brini y Carafoli, 2000). Las diferentes isoformas de esta enzima, al igual que las diferentes isoformas de la PMCA, presentan diez dominios transmembrana (M1-M10) y tres dominios citoplasmáticos donde cabe resaltar el dominio P (de fosforilación) y el dominio N (de unión a nucleótidos), los cuales son altamente conservados entre las diferentes ATPasas tipo P. Dichas enzimas presentan un tamaño promedio de 110 KDa y a diferencia de las PMCAs carecen de un dominio C-terminal regulatorio (Brini y Carafoli, 2009).

Hasta el momento SERCA es la única Ca^{2+} -ATPasa que ha sido cristalizada (Toyoshima y col., 2000) (Fig.7). Actualmente se cuenta con la enzima cristalizada en cada uno de sus estados conformacionales (E1 y E2), en presencia y en ausencia de Ca^{2+} , estas estructuras cristalizadas han permitido descifrar en detalles los cambios conformacionales por los cuales pasa la enzima durante su ciclo catalítico.

SERCA a diferencia de la PMCA, transporta 2 iones Ca^{2+} por ATP hidrolizado cotransportando H^+ en el proceso. La enzima, como el resto de las ATPasas tipo P es inhibida por La^{3+} y ortovanadato. Sin embargo, sus inhibidores específicos son: La Tapsigargina (Tg) (Thastrup y col., 1990), El Acido Ciclopiazonico (Seidler y col., 1989) e hidroquinonas como el Butilhidroquinona (BHQ) (Oldershaw y Taylor 1990). Tanto el CPA como el BHQ, tienen una menor afinidad por la bomba que la Tg, la cual tiene un K_d en el

rango nanomolar). Por otra parte, tanto el CPA como el BHQ, son inhibidores reversible, es decir sus efectos desaparecen tras su remoción del medio mientras que la Tg es un inhibidor irreversible (Brini y Carafoli, 2009). La Tg, es el inhibidor de SERCA mejor estudiado, estando bien caracterizado su mecanismo de acción. Este se une a la bomba estequiométricamente al residuo de Fenilalanina (F) 256 presente en el tercer dominio transmembrana de la enzima, bloqueando de esta manera a la enzima en un estado E_2 libre de Ca^{2+} (Toyoshima y Nomura, 2002).

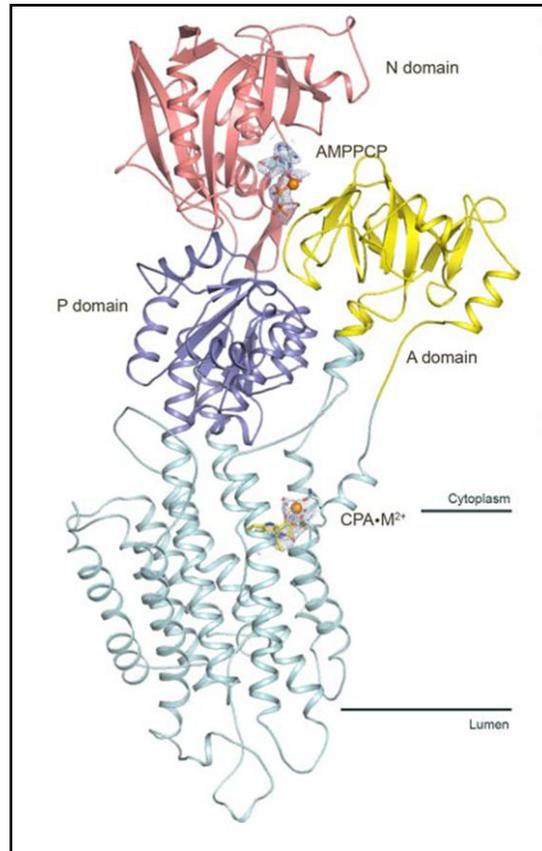


Fig. 7. Modelo de la Ca^{2+} -ATPasa de retículo endo sarco plasmático. La figura muestra el dominio N (rojo), dominio A (amarillo), dominio P (morado) y los 10 dominios transmembrana (azul claro). La figura también muestra dos dominios de unión de AMPPCP (Adenosin metilentrifosfato) y del inhibidor CPA. Figura tomada de Laursen y col., 2009.

1.2.2.1.2. Canales ligando dependiente en el retículo endoplasmático

Principalmente a nivel de retículo endoplasmático, participan dos proteínas en el proceso de liberación de Ca^{2+} , las cuales son canales iónicos sensibles a IP_3 y rianodina respectivamente (Carafoli y col., 2001).

Los receptores IP_3 , son activados tras el aumento del IP_3 vía fosfolipasa C (PLC), este canal presenta un mecanismo bifásico, donde bajas concentraciones de Ca^{2+} lo estimulan mientras que altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico lo inhiben (Taylor y Laude, 2002). Por su parte, los receptores de rianodina son análogos estructurales y funcionales de los receptores de IP_3 (Franzini-Armstrong y Protasi, 1997). Estos canales se caracterizan por promover la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Zarayskiy y col., 2007).

1.2.2.1.3. Sistema de transporte de Ca^{2+} de retículo endoplasmático en tripanosomatidios

Trabajos realizados en células permeabilizadas con digitonina, sugirieron la presencia de un compartimiento intracelular no mitocondrial involucrado en el transporte de Ca^{2+} en *T. cruzi*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *T. brucei* (Moreno y col., 1992a, Philosoph y Zilberstein, 1989) y *T. evansi* (Mendoza y col., 2004). Debido a que la adición de ATP al medio produce la estimulación de la captura de Ca^{2+} , la cual es sensible al vanadato (conocido inhibidor de bombas de Ca^{2+}), e insensible al FCCP (conocido inhibidor del transporte de Ca^{2+} mitocondrial), se sugirió la presencia de una Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA capaz de almacenar Ca^{2+} en el RE de estos parásitos. Este depósito presenta una baja capacidad y una alta afinidad por Ca^{2+} , participando en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ en el rango entre 0.05 - 1.0 μ M (Docampo, 1993).

Existen algunas diferencias en el funcionamiento del RE como depósito de Ca^{2+} , entre tripanosomatidios y eucariotas superiores. En estos últimos la función primaria del IP_3 es liberar Ca^{2+} del RE, resultando en un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$. Aunque se ha demostrado la presencia de IP_3 y de sus precursores, mediante la incorporación de $[^3H]$ inositol en *T. cruzi* (Docampo y Pignataro, 1991) y *T. brucei* (Moreno y col., 1992b), así como la vía de señalización inositolfosfato/diacilglicerol (Docampo y Pignataro, 1991), no se ha podido identificar un depósito de Ca^{2+} sensible a IP_3 , en diferentes tripanosomatidios (Moreno y Docampo 2003).

Adicionalmente, se han descrito diferencias en cuanto a la sensibilidad de SERCA frente al inhibidor específico Tg, el cual produce la liberación de los depósitos de Ca^{2+} sensibles a IP_3 en células de eucariotas superiores (Inesi y col., 2005, Sohoel y col., 2006). Mientras algunos trabajos reportaron que altas concentraciones de Tg son capaces de liberar Ca^{2+} a partir de las mitocondrias de los tripomastigotes y otros no han podido

detectar ningún incremento en la $[Ca^{2+}]_i$; producto del efecto de bajas concentraciones de Tg en *T. brucei*, (Vercesi y col., 1993), *T. cruzi* (Docampo y col., 1993) y *Leishmania mexicana* (Lu y col., 1997), Recientemente se ha descrito la presencia de un depósito de Ca^{2+} sensible a bajas concentraciones (1 μ M) de Tg en *T. brucei* (Ruben y Alkins, 1992) y *T. evansi* (Mendoza y col 2004) generándose así una controversia al respecto. Por otra parte, el ácido ciclopiazonico (CPA), otro conocido inhibidor de Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA en eucariotas superiores, es capaz de inducir una liberación de Ca^{2+} no mitocondrial en *T. cruzi* (Furuya y col., 2001) y en *T. brucei* (Stojdl y Clarke, 1996), no conociéndose su efecto sobre otros tripanosomatidios.

Dada las discrepancias con respecto a la inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de tripanosomatidios por parte de Tg y a la poca información existente sobre el efecto de otros inhibidores de SERCA en estos parásitos, como CPA y derivados de la benzoquinona (BHQ), se hace interesante profundizar a nivel fisiológico y molecular (específicamente sobre los dominios involucrados en la interacción con estos inhibidores), el efecto de estos con el propósito de establecer diferencias funcionales entre SERCA de diferentes tripanosomatidios y la de eucariotas superiores. Sin embargo, el hecho de que Tg tenga un efecto directo sobre el proceso de invasión celular de *T. cruzi* (Neira y col., 2002; Yoshida y col., 2000) y que la expresión de SERCA este íntimamente ligada a la virulencia en tripanosomatidios (Grang y col., 1997; Rodriguez y col., 2002), sugieren que bajas concentraciones de Tg si pudiera tener un efecto sobre SERCA de tripanosomatidios y que quizás el resultado observado por los diferentes investigadores sea producto de la sensibilidad de la metodología utilizada por cada uno de ellos.

1.2.2.2- Sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial

En eucariotas superiores, la mitocondria puede considerarse un reservorio intracelular de Ca^{2+} importante, ya que es capaz de amortiguar incrementos drásticos de Ca^{2+} citoplasmático actuando como un sistema buffer, el cual muestra una alta capacidad de almacenaje pero una baja afinidad por el Ca^{2+} . Las mitocondrias poseen en su membrana interna un sistema de transporte de Ca^{2+} electroforético unidireccional, el cual utiliza como fuerza motor, la diferencia de potencial electroquímico de los protones, entre el espacio intramitocondrial y el citoplasma, para la acumulación de cationes (Moreno y Docampo 2003 y Saris y Carafoli, 2005). Este mecanismo es capaz de acumular grandes concentraciones de Ca^{2+} , el cual puede ser luego liberado a través de un intercambiador electrón neutro (Ca^{2+}/H^+ o Ca^{2+}/Na^+).

Dada la baja afinidad por Ca^{2+} del uniporte electroforético, se pensaba que la mitocondria difícilmente intervenía en la homeostasis del Ca^{2+} durante una señal fisiológica. Sin embargo, dada la proximidad entre el RE y la mitocondria, bajo ciertas condiciones, puede generarse una alta concentración local del catión (microdominios de Ca^{2+}) entre ambos organelos, específicamente en regiones cercanas a los canales de Ca^{2+} presentes en el RE. Esta cercanía permite la activación del uniporte, permitiendo así la participación de este organelo en la homeóstasis del catión (Rutter y Rizzuto, 2000).

1.2.2.2.1. Sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial en tripanosomatidios

El transporte de Ca^{2+} mitocondrial en tripanosomatidios, fue por primera vez demostrado en células intactas de *L. donovani* cargadas con Fura-2AM por Philosoph y Zilberstein en 1989. Posteriormente, este transporte fue evidenciado, en otros tripanosomatidios, mediante el uso del indicador metalocrómico de calcio Arzenazo III, en células permeabilizadas con digitonina. Igualmente, este sistema de transporte se ha caracterizado en: *T. cruzi* (Docampo y Vercesi, 1989 y Vercesi y col. 1991), *T. brucei* (Moreno y col 1992b), *T. evansi* (Mendoza y col 2002), *L. donovani* (Vercesi y Docampo, 1992) y *L. mexicana* (Vercesi y col., 1990).

A partir de los estudios realizados, se concluye que todas las especies de tripanosomatidios estudiadas, poseen un único mitocondrion gigante, con un sistema electroforético unidireccional capaz de incorporar Ca^{2+} , con las mismas características presentes en eucariotas superiores (Moreno y Docampo 2003), como son: la estimulación por fosfatos inorgánicos, acetatos y sustratos respiratorios, tales como succinato, y la inhibición por los bloqueadores clásicos del transporte de electrones como la antimicina A, carbonil cianide *p*-trifluorometoxyfenilhidrazona (FCCP), magnesio (Mg^{+2}) y rojo de rutenio (RR) (Moreno y col., 1992b). Asimismo este sistema presenta una gran capacidad y una baja afinidad (1 μM) por el catión. Por lo tanto, al igual que ocurre en los eucariotas superiores, el transporte de Ca^{2+} mitocondrial no participa directamente en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones fisiológicas (Benaim y Cervino 2000).

1.2.2.3 Otros sistemas de transporte de Ca^{2+} a nivel intracelular en Tripanosomatidios (Sistema de transporte de Ca^{2+} a nivel de acidocalcísoma).

Los acidocalcísoma son organelos ácidos que almacenan Ca^{2+} y pirofosfatos (PPi) y que están presentes en una gran variedad de organismos. Estos fueron

inicialmente descritos con base en sus propiedades fisiológicas en tripanosomas, definiéndose como un compartimiento de almacenamiento de Ca^{2+} no mitocondrial sensible a la nigericina, que es dependiente del gradiente de pH formado por una H^+ -ATPasa sensible a bafilomicina. (Docampo y col., 1995, Scott y col., 1995, Vercesi y col 1997). La captura de Ca^{2+} por este compartimiento ácido aparentemente se debe a la presencia de un sistema $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -ATPasa sensible a vanadato (Fig. 8). Su nombre se debe a la presencia de vacuolas ácidas, que contienen una alta concentración de Ca^{2+} así como una alta actividad ATPasa que transporta H^+ y Ca^{2+} . La presencia de estas bombas en los acidocalcisomas fue respaldada por evidencias inmunoquímicas y moleculares (Lu y col. 1998).

Surge entonces la pregunta de por qué los tripanosomatidios han desarrollado o mantenido a través de su evolución un compartimiento intracelular vacuolar con un sofisticado sistema de transporte de Ca^{2+} como depósito intracelular para la acumulación de Ca^{2+} . Existe la posibilidad que los acidocalcisomas sean necesarios para guardar Ca^{2+} en parásitos que presenten algún estadio intracelular, en el cual estos están sometidos a bajas concentraciones de Ca^{2+} . La entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es un mecanismo de señalización ampliamente reconocido, que surge como respuesta a estímulos extracelulares y que media un gran número de procesos intracelulares. Una posibilidad para poder suplir estas necesidades es tener grandes cantidades de Ca^{2+} acumuladas en compartimientos intracelulares que pueda ser liberado cuando sea necesario. Podemos encontrar en la literatura que existen evidencias que soportan esta hipótesis como son, la presencia de una mayor cantidad de acidocalcisomas, lo que implica un mayor contenido de Ca^{2+} , así como la sobre expresión de la Ca^{2+} -ATPasa de los acidocalcisomas en el estadio intracelulares de *T. cruzi* (Lu y col 1998) y de *L. amazoniense* (Lu y col 1997). También ha surgido la posibilidad que los acidocalcisomas estén involucrados en vías de señalización que requieran de un aumento transitorio de los niveles de Ca^{2+} intracelular procedentes de depósitos intracelulares, como pueden ser los procesos de invasión y diferenciación de estos parásitos (Docampo y Moreno, 1999). Por su parte, este compartimiento también ha sido relacionado con procesos asociados con el mantenimiento del pH, la osmolaridad y la bioenergética de estos parásitos, como depósito de energía por su alto contenido en fósforo (Moreno y Docampo 2009).

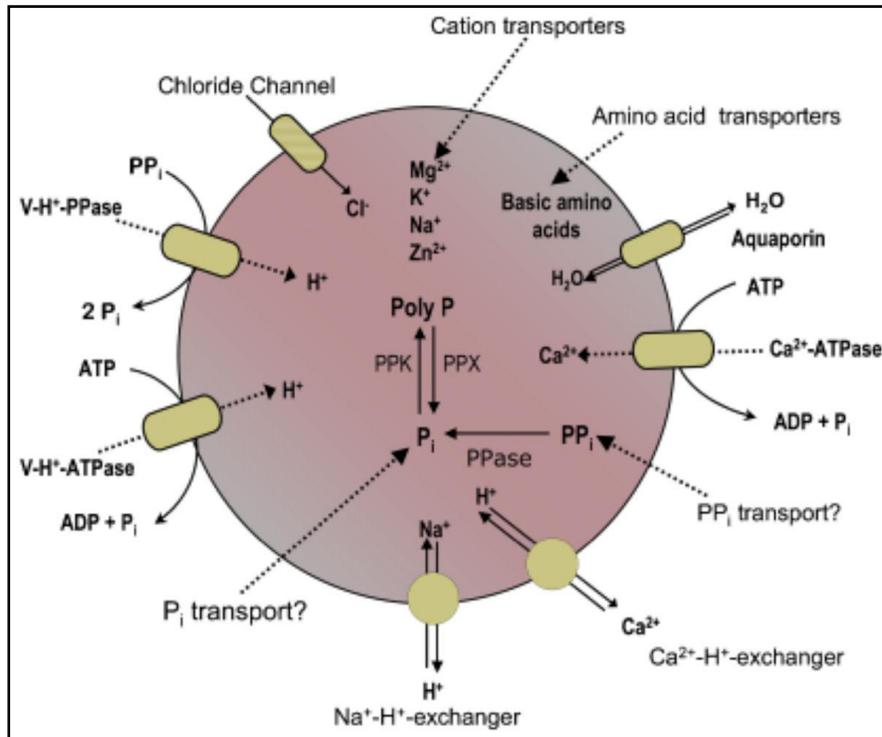


Figura 8. Representación esquemática de los Acidocalsisoma. El gradiente de protones se establece por la acción de una protón ATPasa vacuolar ($V-H^+$ ATPasa) y por una protón pirofosfatasa ($V-H^+$ -PPasa). El transporte de Ca^{2+} es dirigido por una Ca^{2+} -ATPasa vacuolar. En el esquema también se incluyen los intercambiadores Na^+/H^+ y Ca^{2+}/H^+ , canales de Cl^- y de agua o aquaporinas, Transportadores de aminoácidos, fosfatos (P_i) y pirofosfatos (PP_i) Figuras tomada de (Moreno y Docampo, 2009).

1.3-Tripanosomiasis

La tripanosomiasis es un conjunto de enfermedades tropicales, que afectan tanto a humanos como animales, causada por protozoarios unicelulares pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, incluidos en los géneros *Trypanosoma* (T) y *Leishmania* (L), Entre ellos se destacan los hemoparásitos, tales como: *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. mexicana*, *L. donovani*, y *L. braziliensis*, los cuales son los agentes causales de la Tripanosomiasis Americana o mal de Chagas, la Tripanosomiasis Africana o enfermedad del sueño y la Leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea en humanos. La tripanosomiasis animal es causadas por *T. evansi*, *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* y *T. equiperdum*, las cuales afectan animales domésticos y salvajes. En Venezuela, es fundamentalmente causada por *T. evansi* y *T. vivax*, agentes responsables de la tripanosomiasis equina y de la tripanosomiasis bovina, ovina y caprina respectivamente. Estas parasitosis causan efectos negativos en la salud y productividad de sus hospedadores, y pueden conllevar a su muerte, si no se les aplica un tratamiento específico y oportuno. A nivel mundial, son

responsables de grandes pérdidas socioeconómicas, especialmente en países tropicales en vías de desarrollo (Docampo y Moreno, 2001). Por lo tanto, el estudio de la biología de los tripanosomatidios, sus procesos celulares y mecanismos de señalización contribuirá al conocimiento de dichas enfermedades y por ende facilitar su prevención y tratamiento.

1.3.1. *Trypanosoma evansi*

Trypanosoma evansi, es el agente causal de la tripanosomiasis equina, enfermedad conocida como: “Derrengadera”, “Secadera”, “Huequera”, “Surra”, “Mal de Caderas”. La parasitosis generada por este tripanosomatidio ha sido reportada en África, Asia y Sur América, siendo *T. evansi* patógeno para caballos, camellos, búfalos, perros, gatos y algunos animales silvestres incluyendo el vampiro (hematófago), el cual puede actuar como portador y vector. Por su parte, el ganado vacuno, ovino, caprino, porcino, chigüires y pequeños roedores salvajes son considerados reservorios de este parásito (Roy y col. 2010).

La transmisión del agente patógeno se realiza de forma mecánica, de un animal infectado a otro sano, por medio de la picadura de insectos hematófagos como: *Tabanus*, *Stomoxys*, *Lypersoa* y *Haematopota* (Coronado y col 1996 y Roy y col., 2010), La patogenia de la infección por *T. evansi* depende de su virulencia, la susceptibilidad de los hospedadores y las condiciones epizootológicas de la región. En los caballos la enfermedad puede ser de curso agudo o crónico, con episodios de fiebre recurrente relacionada con los ciclos de parasitemia, anemia, edema, caquexia y parálisis de las extremidades, lo que sugiere un daño a nivel del sistema nervioso. Las pérdidas económicas causadas por estas parasitosis se atribuyen principalmente al retraso en el crecimiento, pérdida de peso, reducción de la capacidad productiva, infertilidad y abortos repetitivos, eliminación de animales, muertes y costos derivados de la utilización de medicamentos y asistencia veterinaria. Por lo tanto, esta parasitosis disminuye la productividad de los caballos, los cuales son utilizados como medio de transporte y herramienta de trabajo, indispensables para la tradicional ganadería extensiva.

En Venezuela, la Tripanosomiasis está ampliamente distribuida en las diferentes zonas del país, sin embargo no se han podido realizar estudios sistemáticos que nos indiquen la situación real de esta enfermedad y su impacto económico. Asimismo, a diferencia de otros tripanosomatidios como *T. cruzi* y *L. mexicana*, es muy poco lo que se conoce sobre los sistemas reguladores de Ca^{2+} en *T. evansi*, siendo entonces de gran

interés estudiar y caracterizar funcional y molecularmente los sistemas transportadores de Ca^{2+} en este tripanosomatidio.

2. Objetivos

En lo que respecta al estudio sobre la caracterización de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de eucariotas superiores, nos planteamos el siguientes objetivo general:

1. Caracterización del sitio de interacción del etanol con la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática y su relación con el sitio de interacción de moduladores fisiológicos de la enzima como el diacilglicerol y la ceramida, para así intentar establecer el posible mecanismo de acción de estos compuestos sobre la Ca^{2+} -ATPasa.

Objetivos Específicos:

1a. Estandarización del cultivo y transfección de células COS-7. Expresión de la isoforma hPMCA4b nativa y formas truncadas de esta enzima como: la hPMCA4b $\Delta 44$, hPMCA4b $\Delta 118$ y hPMCA4b $\Delta 139$.

1b. Estudio del efecto del etanol sobre la actividad de la isoforma truncada hPMCA4b $\Delta 118$ y comparación con su efecto en la forma nativa y formas truncadas: PMCA4b $\Delta 44$ y PMCA4b $\Delta 139$, con la finalidad de profundizar en la caracterización del sitio de interacción del etanol con la enzima.

1c. Estudio del efecto de diferentes segundos mensajeros de origen lipídico, como Diacilglicerol y Ceramida sobre las formas truncadas de la PMCA4b: PMCA4b $\Delta 139$, PMCA4b $\Delta 118$ y PMCA4b $\Delta 44$ con la finalidad de establecer la posible participación de la región C-terminal de la enzima en la interacción de estos compuestos sobre la misma.

Con respecto al estudio de la homeostasis de Ca^{2+} en tripanosomatidios y su comparación con eucariotas superiores, en este trabajo profundizamos en el estudio de los mecanismos involucrados en el transporte de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi* planteándonos el siguiente objetivo general:

2. Caracterización fisiológica, bioquímica, inmunológica y molecular de proteína involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*.

Objetivos Específicos

2a. Evidenciar mediante técnicas espectrofluoriméticas la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*.

2b. Evidenciar mediante técnicas Inmunológicas la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi* y establecer posibles diferencias entre éstas y sus homologas en eucariotas superiores.

2c. Evidenciar mediante técnicas moleculares la presencia de genes que codifican para proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*.

3. Metodología

3.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos con el mayor grado de pureza posible. Los inhibidores de proteasas: inhibidor de tripsina, leupeptina y fenil-metilsulfonil-fluoruro (PMSF) fueron obtenidos de Sigma. El fluoróforo (Fura-2AM), fue obtenido de Molecular Probes. Los estándares de proteínas de amplio rango de pesos moleculares fueron adquiridos en Invitrogen. Los anticuerpos primarios 5F10, JA3, H-280, H-300 y N-19 y los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, fosfatasa alcalina, Texas Red e isotiocianato de fluoresceína (FITC), así como el colorante marcador de Retículo Tapsigargina Body-Py fueron obtenidos en Sigma, Santa cruz y Molecular Probes respectivamente. Los marcadores de ADN de peso molecular, las ligasas, Taq-polimerasa, dNTPs y enzimas de restricción fueron obtenidas de: Promega y Biolabs. El medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM), el medio Opit-MEM, los antibióticos y el suero fetal de bovino fueron adquiridos de GIBCO-BRL. La Tapsigargina (Tg), la Benzoquinona (BHQ), el Ac. Ciclopiazónico (CPA) y el 2-Aminoetoxidifenil borato (2APB) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

3.2. Metodología utilizada para tratar de establecer el sitio de interacción del etanol con la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, así como estudiar el efecto del diacilglicerol y la ceramida sobre la Ca^{2+} -ATPasa y tratar de establecer el sitio de interacción y posible mecanismo de acción de estos segundos mensajeros sobre la enzima .

3.2.1. Material Biológico

Cultivo de *Escherichia coli* (DH5 α)

La amplificación de los plásmidos utilizados en este trabajo se realizaron en la cepa bacteriana de *E. coli* DH5 α sensible a antibióticos. La cepa fue mantenida en placas de medio Luria-Bertani (LB) agar, repicadas por método de agotamiento cada 7 días.

Cultivo de las células COS-7

Las células COS-7, una línea celular similar a fibroblasto originalmente obtenidas de riñón de mono, fueron mantenidas en un medio DMEM suplementado con 5% suero fetal de

bovino y 100 µg/ml Penicilina -estreptomycin en una incubadora a 37°C y 4.6% CO₂. Estas células son células adherentes mantenidas en botellas de cultivo y fueron repicadas manteniéndolas siempre en crecimiento exponencial. Para hacer los repiques, las células en crecimiento exponencial fueron separadas del fondo de la botella de cultivo incubándolas con 4 ml de Tripsina/EDTA 1X (Gibco-BRL) durante 5 min a 37°C, posteriormente la Tripsina/EDTA fue inactivada agregando 4 ml de medio DMEM suplementado fresco y estas células fueron entonces visualizadas al microscopio y contadas. Posteriormente fueron repicadas en botellas de cultivo con medio DMEM suplementado fresco manteniendo una densidad de células de 1 x 10⁶ células.

3.2.2. Procesamiento del material biológico

Preparación de membranas de células COS-7 expresadas

Una vez expresadas las proteínas en las células COS-7, se aislaron las membranas de la siguiente manera: se removió el medio de las placas y las células fueron lavadas dos veces con 5 ml de TBS (25 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH=7.4) y recogidas en un Falcon de 15 ml centrifugando a 350-500 g durante 10' a T. amb. El "pellet" fue resuspendido en 800 µl de 10 mM Tris-HCl pH=7.5, 75 µg/ml PMSF, 100 U/ml de aprotinina y 1 mM DTT e incubado 10 min en hielo. Posteriormente las células fueron homogeneizadas 3 veces congelándolas en hielo seco y descongelándolas. Las células fueron entonces sedimentadas en una centrífuga eppendorf a máxima velocidad durante 30 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado, el "pellet" fue resuspendido en 300 µl de 5 mM Tris-HCl pH=8.0 y 10% sacarosa y guardado en alícuotas a -70°C. A estas membranas se les determinó la concentración de proteínas y las mismas fueron analizadas mediante un "immunoblotting".

Obtención de fantasmas de eritrocitos humanos libres de calmodulina

Los fantasmas se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Niggli y col. (1987). 1 lt de sangre humana (tres semanas pos extracción y almacenamiento), fue lavada 2 veces con un medio isotónico que contenía 10 mM Tris-HCl (pH=7.4) y 130 mM KCl centrifugando a 5800 x g durante 10 min y a 4°C. El plasma y los glóbulos blancos fueron removidos por succión y los eritrocitos resultantes fueron hemolizados en 10 volúmenes de una solución hipotónica que contenía 1 mM EDTA y 10 mM Tris-HCl (pH=7.4), centrifugando 2 veces a 21000 x g a 4°C durante 50 y 40 min respectivamente. Los fantasmas de eritrocitos obtenidos en este paso, fueron lavados con 10 mM Hepes (pH=7.4) centrifugando a 21000 x g durante

40 min y a 4°C, 2 ó 3 veces o hasta eliminar la mayor cantidad de hemoglobina. Finalmente los fantasmas fueron lavados 1 ó 2 veces con un medio isotónico que contenía 10 mM Hepes (pH=7.4), 130 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂ y 50 µM CaCl₂ centrifugando bajo las mismas condiciones anteriores. Estos fantasmas resultantes fueron resuspendidos en la mínima cantidad posible de la solución isotónica anterior y guardada a -70 ° C.

Purificación de la Ca²⁺-ATPasa de eritrocitos humanos

La Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de eritrocitos humanos se purificó siguiendo la metodología descrita por Benaim y col. en 1984. Aproximadamente 600 mg de fantasmas de eritrocitos humanos fueron descongelados a temperatura ambiente y su concentración fue llevada a 5 mg/ml con un buffer isotónico que contenía 130 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 50 µM CaCl₂ y 10 mM Hepes (pH=7.4). Seguidamente se solubilizaron las membranas añadiendo gota a gota, en frío y bajo agitación constante, tritón X-100 al 10% v/v hasta una concentración final de 0.5% y se dejó reposar en frío, agitando de vez en cuando durante 10 min. Seguidamente se removió el material no solubilizado mediante una centrifugación a 100000 x g durante 35 min a 4°C y al sobrenadante resultante, el cual contenía la Ca²⁺-ATPasa solubilizada, se le añadió fosfatidilcolina hasta una concentración final de 0.5 mg/ml para estabilizar la enzima. Posteriormente se cargó a 4°C con la muestra, una columna de calmodulina-sefarosa 4B (3 a 4 ml de matriz), previamente equilibrada con 20 ml de un buffer que contenía 130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 100 µM CaCl₂, 0.4% Tritón X-100, 0.5 mg/ml Fosfatidilcolina, 2 mM DTT y 20 mM Hepes (pH=7.3). Una vez cargada la columna a una velocidad de 40 ml/h, ésta fue lavada con 40 ml del mismo buffer anterior. Posteriormente se lavó la columna, a la misma velocidad, con 40 ml de un buffer igual al anterior pero con una menor concentración de detergente (0.05% Triton X-100 en lugar de 0.4%). Finalmente se eluyó la Ca²⁺-ATPasa con 20 ml de un buffer, previamente sonicado, que contenía 130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.05% Tritón X-100, 0.5 mg/ml Fosfatidilcolina, 2 mM DTT, 20 mM Hepes (pH=7.2) y 2 mM EDTA en lugar de CaCl₂. Se recolectaron las fracciones a una velocidad de 10 ml/h, se determinó cuales de ellas presentaban actividad Ca²⁺-ATPásica mediante un ensayo acoplado, se hizo un "pool" con las fracciones que tenían actividad enzimática y posteriormente se le añadió MgCl₂ a una concentración final de 2 mM, CaCl₂ a una concentración final de 50 µM y glicerol a una concentración final de 5% v/v. El volumen total fue distribuido en alícuotas de 300 µl y conservado bajo atmósfera de nitrógeno a -70°C hasta su utilización. Con este procedimiento se obtiene entre 0.7 y 0.8 mg de Ca²⁺-ATPasa pura (una concentración entre 0.1 y 0.2 mg/ml).

Ensayo enzimático acoplado para la determinación de la actividad de la Ca²⁺-ATPasa

Se realizó de acuerdo a Niggli y col., 1979, utilizando un espectrofotómetro Aminco DW-2a, de doble haz y doble longitud de onda. Se determinó la actividad de la Ca²⁺-ATPasa, con el par de longitudes de onda, 366 y 550 nm mediante un ensayo acoplado con las enzimas lactato dehidrogenasa (LDH) y piruvato quinasa (PK).

La Ca²⁺-ATPasa, hidroliza el ATP presente en el medio de reacción y el ADP generado es utilizado por la PK, para la formación de ATP a expensas del consumo de fosfoenolpiruvato (PEP). A su vez, el piruvato generado por la defosforilación del PEP, es reducido a lactato por la LDH. Durante este proceso, el NADH es oxidado a NAD⁺ y se produce una disminución, que se observa como aumento de la absorbancia al par de longitudes de onda indicadas. La oxidación del NADH tiene una estequiometría 1:1 con el ATP hidrolizado.

A dicho ensayo se le agregaron 10 µl de las diferentes fracciones provenientes de la columna y se determina la actividad. El aumento en la actividad es proporcional al cambio en la pendiente. La calibración del ensayo acoplado se realizó con concentraciones conocidas de ADP.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951) con las modificaciones introducidas por Bensadoun y Weinstein (1976) para evitar la interferencia por el detergente y el Hepes. Alternativamente, para la determinación de proteínas en vesículas, se utilizó el método de Biuret (Gornall y col., 1949) en presencia de 0.2% deoxicolato. En ambos casos se utilizó albúmina de suero bovino como patrón.

3.2.3. Métodos Moleculares

Preparación de células químicamente competentes

Una colonia de células de *Escherichia coli* DH5α fue colocada en 2.5 ml de medio 2xYT (16 g/l Bactotripton, 10 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl) y crecida durante toda la noche a 37°C y bajo agitación. Posteriormente, 250 µl de este cultivo fueron transferidos a una fiola con 100 ml de medio 2xYT. El cultivo fue incubado a 37°C bajo agitación hasta que la DO_{600nm} alcanzó 0.4-0.6 DO/ml. Una vez que el cultivo alcanzó esta DO, las células fueron recolectadas centrifugando a 5400 x g durante 10 min a 4°C y resuspendidas en 25 ml de MgCl₂ 0.1 M estéril, se dejaron 20 min en hielo y luego se centrifugaron a 5400 x g durante 10

min a 4°C. El "pellet" de células fue entonces resuspendido en 2.5 ml de CaCl₂ 0.1 M estéril y colocado en hielo durante 1 hora y media, después de lo cual se les colocó 15% glicerol y se guardaron en alícuotas a -70°C en tubos eppendorf autoclavados.

Transformación

Los plásmidos pSG5 con la proteínas nativas y truncadas clonadas y los pVL1393 con las proteínas nativas y truncadas fueron transformados en las células competentes DH5 α , mediante un choque térmico en donde las células competentes se incubaron con el DNA plasmídico por 10 min a 0°C, pasado este tiempo se incubaron a 42°C por 45 seg y se volvió a incubar por 5 min mas a 0°C. Posteriormente se procedió a crecer las células en medio SOC (Extracto de Bacto-levadura 20 g/L, NaCl 0,5 g/L y KCl 25 mM) por 1 H a 37°C. Las células crecidas fueron plaqueadas en agar en presencia de 50 μ g/ml de Ampicilina. Las colonias transformantes fueron analizadas para la obtención a gran escala de los plásmidos de interés.

Aislamiento del ADN plasmídico mediante Mini-Prep

Las colonias seleccionadas fueron crecidas durante la noche a 37°C y bajo agitación en 2.5 ml de 2xYT más 100 μ g/ml Ampicilina para luego aislar los plásmidos mediante una "mini-prep". La "mini-prep" se realizó de la siguiente manera: 1.5 ml de cada cultivo crecido durante la noche fueron transferidos a un tubo eppendorf y las células fueron precipitadas en una centrifuga eppendorf a 4°C durante 2 min. El "pellet" de células fue entonces resuspendido en 100 μ l de un buffer que contenía: 50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl (pH=8.0), 10 mM EDTA y 0.4% lisosima e incubado durante 5 min a T. amb. A continuación, se les agregó 200 μ l de una solución de lisis que contenía: 0.2 M NaOH y 1% SDS, se mezcló suavemente por inversión del tubo eppendorf y se dejó en hielo durante 5 min, después de los cuales se agregaron 150 μ l de una solución que contenía: 3 M KOAc y 5 M HOAc, se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante 5 min más. Posteriormente, se centrifugó 10 min a 4°C en una centrifuga eppendorf , el sobrenadante fue recuperado y transferido a un nuevo eppendorf y el ADN fue extraído, primero con 350 μ l de fenol pH=5.0 y luego con 350 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó 2 min a T. amb. en una centrifuga eppendorf y la fase acuosa superior fue entonces transferida a un nuevo tubo eppendorf donde el ADN fue precipitado añadiendo 750 μ l de EtOH 100% frío y manteniéndolo durante 10 min a T. amb. El ADN precipitado fue entonces centrifugado 15 min a 4°C, el pellet fue lavado con 200 μ l de EtOH 70% frío, secado durante 3 min en un "speed-vac" y resuspendido

en 50 µl de TE 1X. Al ADN resuspendido se le añadió RNAsa libre de DNAsa a una concentración final de 10 µg/ml, se incubó 30 min a 37°C y posteriormente se añadió 30 µl de una solución que contenía: 20 % PEG 6000 y 2.5 M NaCl y se dejó en hielo durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó 15 min a 4°C, el "pellet" se lavó con 200 µl de EtOH 70% frío, se secó durante 3 min en un "speed-vac" y se resuspendió en 20 µl de TE 1X. 1 µl de cada plásmido fue analizado en un gel de agarosa al 1% en su forma circular y después de ser digerido con enzimas de restricción que generaban patrones de restricción conocidos. En algunos casos los plásmidos fueron aislados utilizando el Kit de aislamiento de ADN plasmídico de Bioneer (Accuprep plasmid mini extraction kit).

Digestión con enzimas de restricción de los plásmidos con la secuencia correspondiente a la proteína nativa y las formas truncadas

Los plásmidos pSG5-hPMCA4b, pSG5-hPMCA4b Δ 44, pSG5-hPMCA4b Δ 118 pSG5-hPMCA4b Δ 139 y los plásmidos pVL1393-hPMCA4b, pVL1393-hPMCA4b Δ 44, pVL1393-hPMCA4b Δ 118 y pVL1393-hPMCA4b Δ 139 fueron analizados mediante un pequeño mapa de restricción con las enzimas *EcoRI*, y *BamHI-KpnI* siguiendo las condiciones necesarias de medio de reacción y tiempo de digestión apropiado para cada enzima. En todos los casos se comprobó en un gel de agarosa, la presencia de los fragmentos correspondientes a la secuencia de las proteínas nativas y truncadas, utilizando las enzimas de restricción *BamHI-KpnI* con las que fueron clonadas las mismas.

Aislamiento del DNA plasmídico mediante "Maxi-Prep"

Para aislar ADN en grandes cantidades y con una altísima pureza, necesario para poder expresar la proteína, se utilizó el Kit para "maxi-prep" de QIAGEN. Para ello, 1 colonia de cada mutante fue crecida durante toda el día a 37°C y agitación en 2.5 ml de 2xYT más 100 µg/ml Amp. 100 µl de cada uno de estos cultivos fueron entonces utilizados para inocular 100 ml de LB (10 g/l NaCl, 10 g/l Bactotripton y 5 g/l extracto de levadura) más 100 µg/ml Amp y las células se dejaron creciendo a 37°C y agitación durante toda la noche. Las células fueron entonces recolectadas por centrifugación a 350 x g durante 10 min a 4°C y resuspendidas en 10 ml de buffer de resuspensión P1 (50 mM Tris-HCl pH=8.0, 10 mM EDTA y 100 µg/ml RNAsa), se agregaron 10 ml de buffer de lisis P2 (200 mM NaOH + 0.1% SDS) se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min a T.amb. Se agregaron entonces 10 ml de buffer de neutralización P3 frío (3M acetato de potasio pH=5.5), se mezcló inmediatamente por inversión y se incubó en hielo durante 20 min, después de lo cual se centrifugó 30 min a

4°C a 20000 x g, se descartó el pellet y el sobrenadante se volvió a centrifugar 15 min a 4°C a 20000 x g. El sobrenadante de esta última centrifugación se cargó en la columna QIAGEN-tip 500, la cual había sido previamente equilibrada con 10 ml del buffer de equilibrio QBT (750 mM NaCl, 50 mM Mops pH=7.0, 15 % EtOH y 0.15 % Tritón X-100) y se dejó entrar a la resina por gravedad. Posteriormente, se lavó la columna 2 veces con 30 ml del buffer de lavado QC (1 M NaCl, 50 mM Mops pH=7.0 y 15 % EtOH) y el ADN fue eluido con 15 ml del buffer de elución QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH=8.5 y 15% EtOH). Este ADN fue entonces precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol a T. amb y centrifugado inmediatamente durante 30 min a 4°C a 20000 x g. El sobrenadante de esta centrifugación fue descartado y el "pellet" fue lavado 2 veces con 5 ml de EtOH 70 % centrifugando durante 15 min a 4°C a 20000 x g. Se eliminó entonces el etanol, el "pellet" se dejó secar a T. amb. durante 5 min y se resuspendió en 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH=8.0 y 1 mM EDTA) durante 20 min a T. amb. Posteriormente, se determinó el rendimiento midiendo al espectrofotómetro la concentración del ADN obtenido (entre 500 y 1000 µg) y se analizó la calidad del ADN corriendo 1 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1 %. Una vez que los ADNs fueron chequeados, estos fueron utilizados para expresar las proteínas en células COS-7.

Geles de agarosa

Los plásmidos amplificados fueron visualizados para su caracterización en geles de agarosa. Los geles de agarosa se realizaron fundiendo en un horno microondas el porcentaje de agarosa deseado en 1X TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH=8.3). El ADN se colocó en un buffer de carga 1X el cual contenía: 1X TAE, 6 % glicerol, 2 mM EDTA (pH=8.0), 0.25 % SDS y 0.05 % azul de bromofenol y luego, 5 a 25 µl de muestra conteniendo entre 5 a 500 ng de ADN se cargaron en los bolsillos del gel. El gel se corrió en 1X TAE a 70-80 V y se coloreó 10 min en una solución que contenía 1 µg/ml de Bromuro de Etidio.

Expresión de las proteínas PMCA nativa y truncadas en células COS-7 mediante transfección con lipofectamina

Los ADNs plasmídicos (24 µg) a expresar se diluyeron en un falco de 15 ml estéril con medio Opti-MEM de GIBCO (24 µg de ADN + 1,5 ml de medio por placa o frasco de cultivo). De manera paralela se diluyó en un falco estéril 60 µl de Lipofectamina-2000 de Invitrogen en 1,5 ml de medio Opti-MEM, por cada placa o frasco de cultivo, dejándose incubar a temperatura ambiente por 5 min. Pasado el tiempo de incubación se mezclaron ambas soluciones y se dejó reposando la mezcla durante 20 min. a temperatura

ambiente. A las placas con las células COS-7 en un rango de confluencia entre 90 y 95% (24 horas pre-transfección se sembraron 5×10^6 células por frasco en medio fresco suplementado sin antibiótico), se les removió el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS, se les añadieron los 3 ml de la mezcla DNA-lipofectamina y se cultivaron a 37°C en 5% CO_2 durante 4 horas. Pasado el tiempo de transfección, se retiró el medio con lipofectamina, se lavaron las células con PBS dos veces, se les añadió medio DMEM fresco suplementado al 5% con suero fetal Bovino y se dejaron incubando durante 48 horas, después de las cuales se prepararon las membranas.

Expresión de las proteínas PMCA nativa y truncadas en células COS-7 mediante transfección con Calcio-Fosfato

La transfección se realizó según la metodología descrita por Chen y Okayama 1987. Para ello, placas con las células COS-7 en un rango de confluencia entre 90 y 95% (24 horas pre-transfección se sembraron 5×10^6 células por frasco en medio fresco suplementado sin antibiótico), se les removió el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS y posteriormente se les añadió medio DMEM fresco. En paralelo los DNA plasmídicos de interés, a una concentración 40 $\mu\text{g/ml}$, fueron centrifugados a máxima velocidad en una centrifuga eppendorf durante 30min. a temperatura ambiente para descartar cualquier impureza. El sobrenadante fue diluido dos veces en una solución contentiva de 280mM NaCl, 12mM, D-glucosa, 10mM KCl 1.5 mM, HNa_2PO_4 y 50mM Hepes–NaOH pH 7. A la mezcla se le añadió gota a gota 150 μL de CaCl_2 2M para inducir el precipitado del DNA. Posteriormente, el DNA precipitado fue añadido gota a gota sobre las placas y éstas se incubaron por 24 H a 37°C y 5% CO_2 . Pasado el tiempo, el medio fue removido, las células lavadas 2 veces con PBS y se incubaron bajo las mismas condiciones 24 H mas con medio DMEM suplementado. Posteriormente las células fueron recuperadas para la preparación de las membranas.

3.2.4. Métodos Bioquímicos e Inmunológicos

Determinación de la actividad Ca^{2+} -ATPasa mediante determinación de fósforo inorgánico (Fiske y Subbarow)

La actividad hidrolítica de la Ca^{2+} -ATPasa expresada se determinó mediante la cuantificación de Pi, siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Fiske y Subbarow en 1925, utilizando sulfato ferroso como agente reductor. Aproximadamente 50-70 μg de membranas de células COS-7 controles (sin proteína expresada), con la enzima nativa expresada y con las formas truncadas expresadas se incubaron durante 45 min a 37°C en

250 μl de un medio que contenía: 50 mM Hepes-KOH (pH=7.4), 200 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1.8 mM CaCl_2 (10 μM Ca^{2+} libre), 0.5 mM Ouabaina, 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Oligomicina y 0.5 μM Tapsigargina en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de Etanol. La concentración de Ca^{2+} libre fué calculada utilizando un programa computarizado originalmente descrito por Fabiato y Fabiato (1979) el cual utiliza un cálculo iterativo (Benaim y col., 1991). La reacción se detuvo con 250 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 16 % v/v y finalmente se determinó la cantidad de Pi liberado producto de la hidrólisis de ATP. Brevemente, se tomaron 200 μl de la muestra y se le añadieron 700 μl de una solución de molibdato de amonio al 0.57 %. Este compuesto, forma ácido fosfomolibdico a partir del fósforo inorgánico presente, el cual se reduce al añadir 100 μl de sulfato ferroso (40 % p/v), produciendo un color azul, proporcional al contenido de fósforo inorgánico, el cual fue medido a 830 nm. La concentración de Pi fue calculada de una curva de calibración obtenida con estándares de Pi de concentraciones conocidas. La actividad fue expresada como μmoles de Pi liberado por minuto por mg de proteína. La actividad Ca^{2+} -ATPasa de las enzimas nativas o truncadas expresadas corresponde a la diferencia entre la actividad Mg^{2+} -ATPasa en presencia de EGTA (sin calcio) y la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} (actividad total).

Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (SDS-page)

La electroforesis se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli en 1970. 10-30 μg de proteínas se mezclaron con 1/3 del volumen de solución desnaturante que contenía: 50 mM Tris-HCl (pH=8.0), 5 mM EDTA, 30 % (p/v) Urea, 5% (p/v) SDS, 6 % (p/v) DTT y 4 % (p/v) de azul de bromofenol. Las muestras fueron desnaturadas 5 min a 100°C y corridas en un gel de poliacrilamida al 7.5 % o en un gradiente de poliacrilamida del 5 al 12 %.

Los geles fueron corridos en un buffer que contenía 25 mM Tris-HCl (pH= 8.3), 192 mM Glicina y 0.1% SDS. Posteriormente los geles que no requerían ser transferidos, fueron teñidos con Comasie Blue en una solución que contenía Comasie-blue 0.1 %, 10 % ácido acético y 10 % metanol durante 1h bajo agitación constante y luego decolorados en una solución que contenía 10 % metanol y 10 % ácido acético.

Tinción con plata

En aquellas ocasiones donde se requirió una mayor sensibilidad para la visualización de bandas proteicas, se procedió a teñir los geles con plata. Para ello, los geles fueron fijados en una solución de metanol al 40 % y ácido acético al 10 % durante 30 min. Pasado el tiempo los geles fueron sumergidos en una solución de metanol 10 % , ácido acético 7,5 % por 15 min adicionales. Posteriormente se procedió a lavar tres veces por 10 min con agua desionizada. Inmediatamente los geles fueron sumergidos en una solución de 5 µg/ml DTT durante 30min y posteriormente en una solución de AgNO₃ 2 µg /ml por 30 min. El exceso de plata fue eliminado tras tres lavados rápidos con agua desionizada y se procedió a revelar con una solución de NaCO₃ al 3 % parándose la reacción con la adición de ácido acético al 5%.

Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa

Las proteínas corridas en un gel de electroforesis bajo condiciones disociantes fueron transferidas a un papel de nitrocelulosa siguiendo el método de Towbin y col. 1979 utilizando un aparato de transferencia de Bio-Rad. La transferencia se realizó en un buffer que contenía 25 mM Tris-base, 192 mM Glicina y 20 % metanol pH=8.3. Las condiciones de la transferencia fueron: para geles pequeños 1.5 horas a 4°C y a 113 mA y para geles grandes la transferencia se dejó toda la noche a 4°C y 113 mA.

Immunomarcaje

El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fue bloqueado durante 2 horas y bajo agitación constante en una solución de bloqueo que contenía 3% gelatina de piel de cochino en TBS (20 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.5 M NaCl). Posteriormente se realizó un lavado de 5 min en TBS y 2 lavados de 5 min cada uno en TBS-T (TBS + 0.05% Tween 20). A continuación la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido 1/1000 (anticuerpo policlonal originado contra la Ca²⁺-ATPasa de eritrocitos humanos o diferentes anticuerpos monoclonales (tabla 7) en TBS-T + 1% gelatina de piel de cochino durante 1.5 horas y bajo agitación constante. Posteriormente la membrana fue lavada 3 veces, 5 min cada vez, con TBS-T y luego incubada con el anticuerpo secundario (anti-conejo o anti-ratón acoplado a peroxidasa o fosfatasa alcalina) diluido 1:8000 en TBS-T + 1 % gelatina de piel de cochino durante 1 hora y agitación constante. Finalmente la membrana fue lavada 2 veces, 5 min cada vez, con TBS-T y una vez con TBS durante 5 min y posteriormente fue revelada. Para el caso del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa se reveló en TBS + 0.5 % diaminobencidina, 0.1 % H₂O₂ y 2 % CoCl₂ y para el caso en que se utilizó el anticuerpo

secundario acoplado a fosfatasa alcalina el revelado se realizó en 15 ml de un buffer que contenía 0.1 M Tris-HCl pH 9.5 y 0.5 mM MgCl₂ al cual se le añadía 150 µl de 5-bromo-4-cloro-3 indolilfosfato (BCIP) 15 mg/ml en dimetilformamida y 150 µl de Nitroblue Tetrazolium (NBT) 30 mg/ml en 70% dimetilformamida. Para detener la reacción la membrana fue transferida a agua destilada.

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con ayuda del programa Past, realizándose Anova de una vía para la comparación de todos los controles o tratamientos de las diferentes variables estudiadas y T de Student para realizar comparaciones entre el control y los diferentes tratamientos de una misma variable. Para todos los casos se utilizó un $p \leq 0.01$.

3.3. Metodología usada para profundizar en la caracterización fisiológica, molecular, inmunológica y bioquímica de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca²⁺ en *Trypanosoma evansi*.

3.3.1. Material Biológico

***Trypanosoma evansi* (Mantenimiento y obtención de *T. evansi*)**

El material parasitológico que se utilizó en este trabajo fue TEVA 1 (aislado venezolano 1 de *Trypanosoma evansi*, proveniente del Estado Apure), el cual provino de sangre de un caballo infectado naturalmente, caracterizado por PCR por Desquesnes y Tresse 1996. Las muestras de sangre fueron criopreservadas en nitrógeno líquido en PBS 1% glucosado y DMSO 10%.

Los tripanosomas presentes en las alícuotas de sangre criopreservada se expandieron en ratas de experimentación (Sprague-Dawley), mediante la inoculación de 200 µl de sangre criopreservada (conteniendo tripanosomas viables), por vía intraperitoneal. El curso de la parasitemia de los animales infectados se evaluó a través de la observación directa al microscopio de sangre extraída de la cola de los animales. Cuando la parasitemia alcanzó valores superiores a 10⁶ trip/ml, la sangre fue extraída por punción cardíaca.

Purificación de *Trypanosoma evansi*

Para la purificación de *T. evansi* se utilizó el método de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (Lanham y Godfrey, 1970). Para ello, la sangre extraída se centrifugó a 1000 x g y 4 °C durante 20 min., se descartó el plasma y el sedimento constituido por tripanosomas y células sanguíneas se resuspendieron en una relación 1:3 con PBS (57 mM Na₂PO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 43,8 mM NaCl) más 1 % de glucosa, pH 8,0 (PBSG). Posteriormente la suspensión celular se colocó sobre la columna cromatográfica de DEAE-celulosa (relación 1/3 v/v sangre/resina), previamente equilibrada con PBSG pH 8,0. Los tripanosomas se eluyeron con PBSG y la presencia de los mismos en las fracciones fue confirmada mediante la observación directa al microscopio. Las fracciones que contenían los tripanosomas se centrifugaron a 1000 x g por 10 min, se descartó el sobrenadante y los sedimentos se agruparon, posteriormente los parásitos fueron lavados tres veces por centrifugación con PBSG pH 8,0 y mantenidos en PBSG a 4°C o congelados a -20°C hasta su uso.

3.3.2. Procesamiento del material biológico

Obtención de vesículas de membrana plasmática de *T. evansi*

Las vesículas de membrana plasmática de *T. evansi* fueron preparadas siguiendo la metodología reportada en *Leishmania braziliensis* (Benaim y Romero, 1990, Benaim y col., 1991). Los parásitos fueron lavados dos veces por centrifugación a 1000 x g durante 10 min y a 4°C con un medio que contenía: 11 mM KCl, 140 mM NaCl y 75 mM Tris-HCl, pH 7.4 y una vez con un medio que contenía 400 mM manitol, 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 1mM PMSF (disuelto en 1% DMSO), 0.15 mg/ml inhibidor de tripsina de soya, 10 µg/ml leupeptina y 20 mM Hepes-KOH pH 7.6, centrifugando a 1000 x g durante 10 min a 4°C. Posteriormente el “pellet” de células fue mezclado con perlas de vidrio en una relación 1:4 (peso húmedo de parásitos/peso perlas de vidrio) y las células fueron rotas por abrasión en un mortero a 4°C, entre 5-7 minutos. Los parásitos rotos mecánicamente fueron colectados utilizando el mismo buffer anterior y las perlas de vidrio, las células no rotas y restos de gran tamaño fueron removidos por centrifugación a 1000 x g durante 15 min. a 4°C. El sobrenadante fue sometido a una centrifugación diferencial, primero a 16000 x g durante 30 min a 4°C y luego a 105000 x g durante 1 hora y a 4°C. Posteriormente el “pellet” fue resuspendido en 1 ó 2 ml de un medio que contenía: 150 mM KCl, 1 mM DTT, 50 µM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.15 mg/ml inhibidor de tripsina de soya, 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml E64 y 75 mM Hepes-KOH, pH 6.8. La suspensión fue homogeneizada pasándola 3 veces a través de un

homogeneizador "Dounce AA" inmerso en hielo y guardadas a -70°C hasta su utilización. Esta preparación permite obtener una fracción altamente enriquecida en membrana plasmática de *T. evansi*.

Evaluación de los niveles de Ca²⁺ intracelular en poblaciones de *T. evansi* por espectrofluorimetría

Para realizar las mediciones de Ca²⁺ intracelular se utilizó el indicador fluorescente radiométrico Fura 2/AM diluido en 0.1% DMSO a una concentración de 1 mM. Los parásitos fueron cargados con el indicador según el método propuesto por Mendoza y col. 2001. Los parásitos fueron lavados dos veces con solución PBS-G (57 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 43.8 mM NaCl y 1% Glucosa), e incubados en esta misma solución con 6 µM Fura 2/AM a temperatura ambiente y en agitación suave durante 45 min. Posteriormente fueron lavados una vez con PBS-G y otra con solución Tyrode Ca²⁺ (145 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 11 mM Glucosa). Las mediciones se realizaron utilizando solución Tyrode Ca²⁺ en la cubeta. Una vez cargados los parásitos, fueron colocados 500 µl en una cubeta de cuarzo de 1 ml de capacidad y 4 mm de diámetro óptico. Se utilizó un espectrofluorímetro HITACHI 2000 acoplado a un PC (IBM compatible) con un sistema de adquisición de datos, estableciéndose las siguientes condiciones: Velocidad de cambio 340/380 nm: 2 seg.; Apertura de excitación: 10 nm.; Apertura de emisión: 10 nm. y Velocidad de barrido: 1200 nm/min. La cubeta fue colocada durante el experimento dentro de un sistema de láminas acopladas a un baño termocontrolado, manteniéndose la temperatura en 29 °C. El sistema tiene acoplado un dispositivo para agitación constante, a través de un minimagneto garantizándose así que los parásitos no sedimenten y los reactivos añadidos se distribuyan homogéneamente. Utilizando esta metodología se pudo determinar los niveles de Ca²⁺ intracelular y evaluar el efecto de diferentes drogas que afectan la homeostasis de este catión.

Para conocer la concentración intracelular de Ca²⁺ fue necesario calibrar el sistema, para ello se utilizó el método de Grynkiewicz y col. (1985) aplicando la siguiente ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] \times [F_{min}(380) / F_{max}(380)]$$

Donde el K_d es la constante de disociación del Fura-2, R es la relación de fluorescencia de excitación a 340/380 nm, R_{max} y F_{max} son la relación de fluorescencia de excitación a 340/380 nm y la fluorescencia del fura-2 a 380 nm respectivamente, a concentraciones

de Ca^{2+} saturante. El R_{\min} y F_{\min} son la relación de fluorescencia de excitación a 340/380 nm y la fluorescencia del fura-2 a 380 nm respectivamente, en ausencia de Ca^{2+} . El K_d a emplear para los cálculos de Ca^{2+} intracelular es de 224 nM (Grynkiewicz y col., 1985).

3.3.3. Métodos Moleculares

Aislamiento del ADN genómico de *T. evansi*

El ADN de *T. evansi* fue purificado a partir de parásitos purificados utilizando el estuche de aislamiento de ADN genómico de Promega (Wizard Genomic DNA purification kit), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

Diseño de los oligos empleados

Todos los cebadores empleados fueron diseñados con el programa Oligo Explorer 1.2, tomando como molde el genoma de *Trypanosoma brucei* strain 927 (WWW.Sanger.ac.uk/projects/t.brucei) para los genes identificados como: Posibles Ca^{2+} -ATPasas de Membrana Plasmática (PMCA) (Gene DB # Tb 927.81200, #NCBI XM 841864.1 y gi: 72392313), Posibles Ca^{2+} -ATPasas vacuolares o de Acidocalcisomas (VCA), (Gene DB # Tb 7927.81160, #NCBI NC00728.1 y gi: 70802983), para posible Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplasmático (SERCA) (Gene DB # Tb 927.53400, #NCBI AAZ11451.1 y gi: 70801544) y para un posible canal putativo de Ca^{2+} (CaCh) (# NCBI XP 822541.1 y gi: 70832209). La Tabla 4 muestra los cebadores diseñados basados en los dominios conservados que caracterizan a las Ca^{2+} -ATPasas tipo P. Cada uno de estos oligos fue diseñado tanto en dirección 5'...3' como en 3'...5' para poder agruparlos en pares y así amplificar fragmentos de los genes que posean dichos dominios. La Tabla 5 muestra los cebadores específicos para las regiones aleatorias particulares de cada gen, de manera de poder cubrir la secuencia completa del mismo. Igualmente, la Tabla 6 muestra las secuencias de los cebadores específicos diseñados sobre secuencias aleatorias a todo lo largo del gen que codifica para el putativo canal de Ca^{2+} .

Tabla 4. Oligos de dominios conservados de Ca²⁺-ATPasas de *T.brucei*

Nombre	Secuencia en aa	Secuencia en nucleótidos	Dominios Conservados
DC1	EIVVGD	F: AAATTGTTGTGGGTGA R: TCACCCACAACAATTT	Dominio citosólico entre las regiones transmembrana II y III
DC2	CSDKTGTLT	F:GTAGTGATAAACTGGGACGCTGAC R:GTCAGCGTCCCAGTTTTATCACTAC	Dominio de Fosforilación de ATP
DC3	AVTGDGTND	F:CTGTGACTGGTGTATGGGACAAATGA R: TCATTTGTCCCATCACCAGTCACAG	Dominio de unión de ATP
DC4	VQLLWVNL	F: TACAGCTGTTATGGGTAAATC R: AGATTTACCCATAACAGCTGTA	Dominio citoplasmático Extremo C-terminal

Tabla 5. Oligos de dominios no-conservados ubicados aleatoriamente en las secuencia de posibles PMCA, VCA y SERCA en *T.brucei*

Nombre	Secuencia en nucleótidos	Posición
PMCA1	F: CATAAGACACAAGTATCAC	28-47
PMCA2	R: CCACATTACCTGGTAAAA	1333-1351
PMCA3	R: CATAACAAGGTTGCGGAAGTCC	2000-2023
PMCA4	F: CTTGGCATGTGCAACCGATACT	1627-1649
PMCA5	R: ACTTGAAACGCAATGCACGAACC	2799-2822
PMCA6	R: ACCATCCTTAATGTGTCA	3221-3239
VCA 1	F: ATGATTTCCCAAAAGA	1-17
VCA 2	R: AACTATTCAGTGCAAGA	1379-1396
VCA 3	R: ATACACAAGGTTGCGGAAGTCCT	2077-2100
VCA 4	F: CGGATGGAGTTGTGATGCAGTA	1658-1680
VCA 5	R: CCCCTTCGCCTTTAACCACTTA	2711-2733
VCA 6	R: TCATCTAATACGTTCTCG	3290-3309
SERCA1	F: ATG CTA CCC GAG ACC TT	1-17
SERCA2	R: CGG CAA CTT TGA GGC A	900-916
SERCA3	F: GCG TGA GCA GGA GGA AG	714-731
SERCA4	R: TCT GCC TTT TTG AGT GCC G	2122-2141
SERCA5	R: CTA GTC CTT CTT CTT TTC CTG G	3401-3423
SERCA8	F :GCTATTCCCGAGGGTC	934-951
SERCA8	R: TTA CCA AAA GGG CTG CC	1341-1358
SERCA9	F: CGACTGAGGCAGCCCTTT	1334-1352
SERCA9	R: CCAATGCAACGAAGAGCG	1671-1689
SERCA10	F: GGTGCCAACGCTCTTCG	1662-1679
SERCA11	F: GGT GTA AAT GAC GCT CC	2107-2124
SERCA11	R: AGT CCT TCT TCT TTT CCT G	3016-3035
SERCA12	F: GAA GCG TAG CCT ATC CCC C A	-235-(-217)
SERCA12	R: ACA TCG CCT GGA ACC AAC T	433-452
SERCA13	F: GGC TGC GTT GCG TGT AGA TA	157-177
SERCA13	R: TGT GGG TTT ATG GGT TGC GTA	818-839
SERCA14	F: AAT GCC TTG GTA CGG GAT	1393-1411

SERCA14	R: TGC TGA ACT GCC TTT GTC GG	2088-2108
SERCA15	F: AAA GGC AGT TCA GCA CG	2094-2111
SERCA15	R: CGG TCT GGA GCA TTG AAG	2807-2825
SERCA16	F: GGC TTC AAT GCT CCA GAC	2806-2823
SERCA16	R: GCA CAA CCG TCC GTA ACA A	3536-3555

Tabla 6. Oligos de dominios específicos del putativo Canal de Ca²⁺ en *T. brucei*

Nombre	Secuencia de nucleótido	Posición
ChCa1	F: ATGGCTGAGCCGCCA R: AATCGCCCGTTGATCAACTT	1-912
ChCa 2	F: TGTTGAGACGCTCTCACTG R: GTGGGGATTTCCGTATGTTG	800-1605
ChCa 3	F: TCAGTTGTGCCGCTTTAACC R: ACCCCCACTGGCAATATCAC	1500-2166
ChCa 4	F: CGAACAGCCAAACAAGCATC R: TTGAGGGGTGTGAGACCAAA	2000-2915
Canal 5	F: TGGGGAATTGTACGTAATAT R: TCACGAGTATATGAGAATGC	2800-3683
ChCa 6	F: TGTTGTATGCGTTGTTCTTC R: GAAGGGGATGGTCTATCAAT	3500-4382
ChCa 7	F: GCAGCGTCACATAAACCCAT R: TCGAACAGCAACATTCCACA	4200-5036
ChCa 8	F: CGGAGTTCGCGTCAACTGCT R: CGCACTTTGGGCAACCATTTC	4900-5870
ChCa 9	F: TTGTCTGCCGACAGTAGCGA R: ACCTAGCCGCAGCATACGAA	5700-6555
ChCa 10	F: AAGATTGGAGCCCACGGAAT R: GGAGCGCTTACCAAGCACTG	6400-7362
ChCa 11	F: GCGAGAGTATGACATTCCAA R: CTA CTCTGGTGCTGTAGGTCC	7173-8082
ChCa 12	F: CATACTTTGGTCCGCAT R: TGATGTCTCTTGCAGCAG	1184-1704

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las secuencias de interés fueron amplificadas mediante la técnica de PCR. Las condiciones para cada PCR fueron establecidas según las características del par de cebadores correspondiente empleados. La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl, empleando una solución 1X Master Mix (Promega), 10 ng de ADN como templado, 10 nM de los cebadores de interés, bajo las siguientes condiciones de ciclado: un primer paso de desnaturalización de 1 minuto a 94°C, 35 ciclos de 3 pasos que corresponden a: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de hibridación (45 – 60°C) correspondiente para cada par de cebadores y 1 minuto de extensión a 72°C, seguido por un último ciclo de extensión de 3 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al (0.8 - 2%) en una cámara horizontal a 100V por 1 hora, y visualizados con SYBR-safe™ en un transiluminador de luz UV. Los productos de PCR fueron

purificados mediante el Kit de purificación de productos de PCR (Promega o Bionner), siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

Los productos fueron enviados a secuenciar en el CESSAN – IVIC a la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses U.E.G.F. - IVIC (CeSAAN) ubicado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y en el servicio de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur, Montevideo. La secuenciación de los productos en el IVIC se realizó mediante un secuenciador automático de 16 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems) mientras que la secuenciación en el Instituto Pasteur se realizó mediante un secuenciador automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems), ambos se fundamentan en el Método enzimático de Sanger.

3.3.4. Análisis de las secuencias nucleotídica obtenidas *in silico*.

Ensamblaje de la secuencia consenso de cada gen de interés

Los fentogramas obtenidos, fueron analizados con los programas Sequence Scanner versión 1.0 y CHROMAS versión 1.45. Las secuencias depuradas fueron alineadas con el uso del programa “***Biolign alignment and multiple contig editor***”.

Caracterización de la secuencias obtenidas *in silico*

Una vez obtenidas las secuencias de los respectivos genes de interés procedimos a su identificación y caracterización *in silico* mediante el uso de los programas presentes en el servidor de herramientas moleculares “***Expasy***” (<http://www.expasy.org/tools/>).

Programas para la búsqueda de Similaridad

Cada una de nuestras secuencias fueron analizada mediante un BLAST (de sus siglas en ingles: Herramientas de Búsqueda de Alineamiento Básico Local) usando las bases de datos de ***BLAST NCBI*** (de sus siglas en ingles: Centro Nacional de Información Biotecnológica) y de ***SEQUEROME***, programa de búsqueda BAST de la Universidad de Geogetown.

Programa de Búsqueda de Dominios

- Cada una de nuestras secuencias fue analizada con el programa **Inter Pro Scan** “Integrated search in PROSITE, Pfam, PRINTS and other family and domain databases”, con la finalidad de identificar en ellas dominios conservados y motivos

específicos. Adicionalmente, las secuencias de las posibles PMCA, SERCA, Ca²⁺-ATPasa vacuolar (VCa²⁺) y Canal putativo de Ca²⁺, fueron analizadas con el programa "**Calmodulin Target Database**", con la finalidad de búsqueda de posibles dominios de unión a CaM.

Programas de Predicción Topográfica

Nuestras secuencias fueron analizadas con los programas:

- **TopPred** "Topology prediction of membrane proteins" (von Heijne, G., 1992; Claros, M.G., y von Heijne, G., 1994); Deveaud and Schuerer (Institut Pasteur) new implementation of the original toppred program, based on G. von Heijne algorithm).
- **HMMTOP** "Prediction of transmembrane helices and topology of proteins (Hungarian Academy of Sciences)" (Tusnády y Simon, 1998; Tusnády y Simon, 2001).
- **TMHMM** "Prediction of transmembrane helices in proteins (CBS; Denmark)".

Programas de Análisis de Estructura Primaria

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa **Compute PI/Mw** "Compute the theoretical isoelectric point (*pI*) and molecular weight (*Mw*) from a UniProt Knowledgebase entry or for a user sequence", con el fin de obtener información sobre su composición aminoacídica, tamaño relativo y posible punto isoeléctrico.

Programas de Modelaje Molecular

Las secuencias obtenidas fueron modeladas con ayuda del programa "**Phyre**" (Successor of 3D PSSM). Los modelos obtenidos fueron visualizados con los programas "**RasWin Molecular Graphics**" versión 2.7 y "**Molsoft MolBrowser**" versión 3.7.

3.3.5. Métodos Inmunológicos

Inmunomarcaje

Se empleó un homogenato (SERCA) o vesículas de membrana plasmática (PMCA, Canal) de *T. evansi* como antígeno. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE (Laemmli.; 1970) en geles al 7.5 % y electrotransferidas (Towbin y col., 1979) a

papeles de nitrocelulosa, como fue descrito anteriormente. Se emplearon como anticuerpos primarios y secundarios los listados en la Tabla 7.

Las transferencias fueron bloqueadas por 2 hora con TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5 y 0.5 M NaCl) más 3 % gelatina a temperatura ambiente. Luego incubadas durante 1h con los anticuerpos primarios de interés, diluidos en TBS más 1 % gelatina. Posteriormente, se incubó con los anticuerpos secundarios correspondiente durante 1 hora en el mismo buffer. Entre cada paso, se realizan 3 lavados de 5 min. con TBS mas 0.05 % Tween 20. Cuando se emplearon anticuerpos secundarios acoplados a HRP (horseradish peroxidada) se reveló con el sustrato 0.5 % diaminobencidina en TBS más 0.1 % H₂O₂ y 2 % CoCl₂. Cuando se emplearon anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina se reveló con 5-bromo-4-cloro-3 indolilfosfato (BCIP) 15 mg/ml en 100% dimetilformamida y Nitroblue Tetrazolium (NBT) 30 mg/ml en 70% dimetilformamida, en Buffer 0.1 M Tris-HCl pH 9.5 más 0.5 mM MgCl₂. Para detener la reacción la membrana fue transferida a agua destilada.

Tabla 7.- Anticuerpos utilizados para el Inmunomarcaje

Anticuerpo primario	Proteína y epítopo	Dilución Utilizada	Anticuerpo secundario
5F10sc	PMCA ¼ Epítopo aa 719-738 (Monoclonal)	1/200	Anti mouse IgG Acoplada a Fosfatasa Alcalina 1/10000
JA3sc	PMCA 4b Epítopo aa 1135-1205 (Monoclonal)	1/200	Anti mouse IgG Acoplada a Fosfatasa Alcalina 1/10000
Policlonal PMCA (Elaborado en nuestro laboratorio)	PMCA de eritrocitos humanos (Policlonal)	1/200	Anti Rabbit IgG Acoplada a peroxidasa
H280sc	α1C Canal de Ca ²⁺ tipo L Epítopo aa 1721-2000 (Policlonal)	1/500	Anti rabbit IgG Acoplada a HRP 1/10000
H300sc	SERCA 1/2/3 Epítopo aa 1-300 (Policlonal)	1/500	Anti rabbit IgG Acoplada a HRP 1/10000
N19sc	SERCA 1 Epítopo Region N-Terminal (Policlonal)	1/500	Anti goat IgG Acoplada a HRP 1/10000

sc: Anticuerpos de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology

Inmunolocalización empleando microscopía confocal

Los parásitos (*T. evansi*) purificados fueron fijados con 1% Formaldehído en PBS pH 8 (95 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaH₂PO₄ y 150 mM NaCl) por 15 min. y adheridos a portaobjetos cubiertos con polilicina por 20 min. después de lo cual fueron permeabilizados con Tritón 0,1 % en PBS por 5 min., entre cada paso se hicieron lavados 2 veces por centrifugación, con PBS pH 8, a 1000 x g por 2 min. Posteriormente, fueron incubados con el/los anticuerpos primarios de interés por 1 hora y los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a diferentes fluoróforos diluidos en PBS (Tabla 8) por 1 hora, entre cada paso se hicieron lavados 2 veces por agitación en PBS, por 2 min. Para determinar la localización de los antígenos de interés se realizó doble marcaje empleando anticuerpos primarios específicos contra Tubulina o Dineína, proteínas del citoesqueleto, o con 0.25 µM Tapsigargina body-Py, marcador específico del retículo endoplasmático.

La fluorescencia de estos marcajes fueron cuantificados mediante un sistema de imágenes confocal *Nikon C1*, acoplado a una unidad de láser C1-LU2, la cual está equipada con dos tipos de láser: Argón (488 nm) y Neón (543 nm). Esta unidad de láser es controlada mediante una interfase D-eclipse C1. Este sistema se encuentra acoplado a un microscopio invertido *Nikon Diaphot-TMD* (Tokyo, Japón), el cual contiene un objetivo de inmersión de aceite (Ph4L) *Nikon 100/1.40* (Tokyo, Japón).

Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados para Inmunolocalización

Marcador específico	Reconocimiento	Dilución utilizada	Anticuerpo secundario
Ac SC 5F10	PMCA 1/4 Epitope aa 719-738 (Monoclonal)	1/100	Anti- mouse acoplado a FICT 1/100
Ac SC H280	α1C Canal de Ca ²⁺ tipo L Epitope aa 1721-200 (Policlonal)	1/100	Anti- Rabbit acoplado a TR 1/100
Ac SC H300	SERCA 1/2/3 Epitope aa 1-300 (Policlonal)	1/100	Anti- Rabbit acoplado a TR 1/100
Ac SC α- DYNLL1/2 (89732)	Dineína Epitope Proteína completa del citoesqueleto (Monoclonal)	1/100	Anti- mouse acoplado a FICT 1/100
Ac α- Tubulina sc	Tubulina Epitope (Monoclonal)	1/500	Anti- mouse acoplado a FICT 1/100
Tapsigargina Body-Py	SERCA Reticulo endoplasmático	1/100	-

Ac SC: Anticuerpos de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology

Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación de las proteínas de interés (PMCA, Canal) de la membrana de *T. evansi*, se incubaron las membranas de nitrocelulosa con los anticuerpos específicos: 5F10 y H280 en una dilución de 1/20 con PBS (95 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl), por 1 h y se bloquearon con 5% BSA-PBS durante 1 h. Posteriormente, se procedió a la inmunoabsorción de los antígenos correspondientes presentes en la fracción de vesículas de membrana de *T. evansi*, durante toda la noche a 4°C. Entre cada paso las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS por agitación suave, durante 15 min. Las proteínas inmunoabsorbidas fueron extraídas mediante la incubación con Glicina 100 mM pH 2, durante 20 min. Posteriormente, se tituló la solución a pH 7.4 con Tris-base concentrado. La glicina fue eliminada y las proteínas fueron concentradas por centrifugación a 2500 x g mediante el uso de centricones. El análisis de las proteínas fue realizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5 % en SDS-PAGE como se indicó anteriormente y visualizadas mediante tinción con plata.

3.3.6. Métodos Bioquímicos

Determinación de la actividad Ca²⁺-ATPasa en Vesículas de Membranas Plasmática de *T. evansi*

Para determinar la actividad Ca²⁺-ATPasa en las vesículas de membrana plasmática de *T. evansi*, 0.5 mg/ml de proteína fueron incubadas en buffer Hepes pH 7.4 (75 mM Hepes-KOH, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂) más 1 mM DTT, 1 mM ATP e inhibidores de proteasas, 1 mM PMSF, 0.15 mg/ml inhibidor de tripsina de soya, 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml E64 y 1 mM EGTA mas CaCl₂ para obtener la concentración final de 10 µM. La incubación se llevó a cabo durante 45 min., a 28°C y se detuvo añadiendo TCA al 8 %. La mezcla se centrifugó a 1000 x g en una centrifuga eppendorf y el sobrenadante se utilizó para determinar la cantidad de Pi producido mediante una modificación del método de Fiske y Subbarow, 1925 como se describió anteriormente. La actividad Ca²⁺-ATPasa en las vesículas de estos tripanosomatideos fue expresada como la diferencia entre la actividad Mg²⁺-ATPasa en presencia de EGTA (sin calcio) y la actividad Ca²⁺-ATPasa en presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺ (actividad total).

Purificación de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *T. evansi* mediante cromatografía de afinidad.

La Ca²⁺-ATPasa de *T. evansi* se purificó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente con las siguientes modificaciones: La fracción de vesículas de membrana plasmática de *T. evansi* obtenida fue diluida a una concentración final de 3 mg/ml con un Buffer Hepes pH 6.8 (75 mM Hepes-KOH, 150 mM KCl, 50 µM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) más 1 mM DTT e inhibidores de proteasas: 1 mM PMSF, 0.15 mg/ml inhibidor de tripsina de soya, 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml E64 y solubilizadas añadiendo gota a gota, bajo agitación a 4°C, Tritón X-100 a una concentración final de 0.5%. El resto del procedimiento se realizó sin cambios.

Marcaje con calmodulina biotinilada

Las proteínas presentes en el homogenato de *T. evansi* fueron separadas por electroforesis SDS-PAGE en geles al 7.5 %, electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa como se describió anteriormente y luego bloqueadas con 5% BSA en TBS-T pH 8.8 (25 mM Tris-HCl pH 8.8, 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl y 0.1 % Tween 20) en presencia de 0.2 mM CaCl₂ o en ausencia de Ca²⁺ colocando 1 mM EGTA, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron incubadas primero con calmodulina biotinilada (0.9 mg/ml) a una dilución 1/2000 en buffer TBS pH 8.8 con o sin Ca²⁺ y segundo con estreptoavidina conjugada a peroxidasa diluida 1:3000 en TBS pH 8.8 (25 mM Tris-HCl pH 8.8, 150 mM NaCl y 2,7 mM KCl) en ausencia o presencia de Ca²⁺, por 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Entre cada paso las membranas fueron lavadas 3 veces durante 30 min con TBS pH 8.8 con o sin calcio. La detección de las proteínas unidas a CaM se realizó mediante quimioluminiscencia, empleando el estuche de detección ECL de la casa comercial Amersham Life Science.

4. Resultados

4.1. Modulación de la Ca^{2+} ATPasa 4b de humanos por Etanol y segundos mensajeros de origen lipídicos

Con la finalidad de profundizar en la caracterización del sitio de interacción del etanol con la PMCA de membrana plasmática isoforma 4b y observar la posible relación de este dominio con el sitio de interacción de moduladores fisiológicos de la enzima como el diacilglicerol y la ceramida, así como tratar de dilucidar el posible mecanismo de acción de estos compuestos sobre la misma, nos propusimos sobreexpresar la forma nativa y diferentes formas truncadas ($\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$) de la PMCA 4b de humanos en un sistema de expresión altamente caracterizado en células COS-7. Para ello en primer lugar estandarizamos el método de expresión de las diferentes proteínas, dicha expresión fue caracterizada mediante inmunomarcaje y su funcionalidad mediante ensayos enzimáticos.

4.1.1. Estandarización del Sistema de Expresión COS-7

Para la expresión de las diferentes proteínas en las células COS-7, tuvimos que obtener en primer lugar los plásmidos recombinantes con los genes que codifican para la forma nativa y formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ de PMCA4b. El plásmido utilizado para dicha expresión fue el *pSG5* y los genes correspondiente a las diferentes proteínas fueron obtenidos de plásmidos *pVI1393* contentivos de los genes respectivos. Estos últimos plásmidos son exclusivos para sistema de expresión por Baculovirus. Es importante mencionar que estos genes fueron clonados en los plásmidos *pVL1393* mediante el uso de los sitios de restricción *BamHI* y *KpnI*, por lo que fueron obtenidos mediante el uso de estas enzimas de restricción y clonados en los mismos sitios en el plásmido *pSG5*.

Los productos de las diferentes digestiones fueron corridos en un gel de agarosa y posteriormente las bandas correspondientes a las secuencias codificantes de las proteínas de interés, fueron purificadas con ayuda del Kit de purificación de ADN en geles de agarosa (Promega). Una vez purificados los insertos de interés, se procedió al ligamiento de éstos con en el plásmido *pSG5* utilizando para ello la enzima T4 ligasa, éste proceso metodológico se resume en el esquema de la figura 9. Es importante mencionar que previo al ligamiento de los insertos en el plásmido *pSG5*, el plásmido fue linearizado y desfosforilado para evitar su recirculación, mediante su digestión con *BamHI* y tratamiento con la enzima fosfatasa alcalina respectivamente.

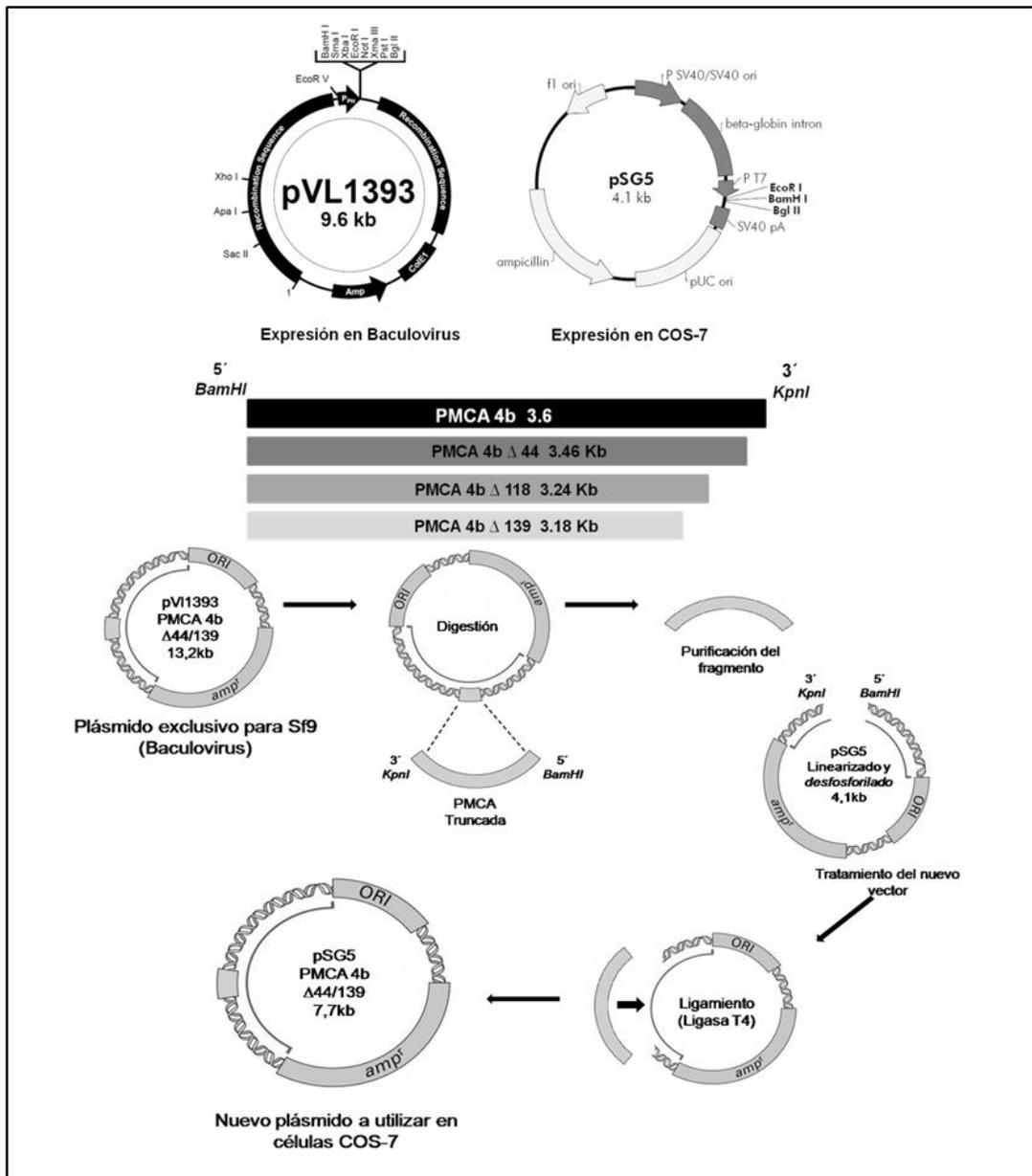


Figura 9. Esquema de construcción de los plásmidos pSG5 PMCA4b Silvestre, PMCA Δ 44, PMCA Δ 118 y pSG5 PMCA Δ 139. Parte superior de la figura muestra el esquema de los plásmidos pVL1393 y pSG5 destacándose la región de clonamiento donde fueron insertadas las secuencias que codifican para la PMCA4b nativa y sus formas truncadas. En la parte inferior del esquema se muestra paso a paso el proceso de ligamiento de las secuencias deseadas en el plásmido pSG5. Primero se sometieron los plásmidos a la acción de las enzimas *KpnI* y *BamHI*. Posteriormente los fragmentos de interés purificados fueron ligados al plásmido pSG5 y se procedió a la caracterización de los plásmidos recircularizados.

La figura 10 A muestra el producto de digestión de los plásmidos pV1393 Sil, $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ con *BamHI* y *KpnI* y pSG5 linearizado. La figura 10 B, muestra los insertos Sil, $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ purificados y nuevamente el plásmido pSG5 linearizado, así como también los productos del ligamiento entre el plásmido pSG5 y los diferentes insertos purificados.

En la figura 10 A, puede observarse en el segundo carril dos bandas de tamaño aparente de 4.1 y 4 Kb correspondiente a los productos de digestión del plásmido pSG5 con las enzimas *BamHI* y *KpnI*. En los carriles 3, 4, 5 y 6 se muestran los productos de digestión de los plásmidos PVL1393-PMCa4b, PVL1393-PMCa $\Delta 44$, PVL1393-PMCa $\Delta 118$ y PVL1393-PMCA $\Delta 139$ con estas mismas enzimas. Se puede observar en cada una de las 4 digestiones dos bandas correspondientes al plásmido pVL1393 (9.6 Kb) y los insertos de interés (PMCA4b de 3.6 Kb, $\Delta 44$ de 3,46 Kb $\Delta 118$ de 3, 2 Kb y $\Delta 139$ de 3,18 Kb). Posteriormente se procedió a purificar apartir del gel las bandas de interés, las cuales se muestran en la figura 10 B en los carriles 1, 2, 3, 4 y 5 y subsiguientemente a ligar los insertos al plásmido pSG5. Los productos del ligamiento se observan en la figura 10B carriles 6, 7, 8 y 9 señalándose en la figura las posibles bandas correspondientes al plásmido con los insertos ligados, las cuales fueron purificadas para su caracterización.

Una vez obtenido los plásmidos, procedimos a transformar células químicamente competentes de la cepa bacteriana de *E. coli* DH5 α . La cepa escogida es sensible a antibióticos por lo que solo las células transformantes con los plásmidos de interés adquirirán resistencia a ampicilina. A cada una de las colonias transformantes obtenidas, se les realizó un aislamiento de ADN plasmídico usando el método de "miniprep", para verificar si los plásmidos que le confieren la resistencia al antibiótico, poseen los insertos para la PMCA4b y sus tres formas truncadas respectivamente.

Una vez corroborado que los tamaños de los insertos plasmídicos obtenidos en las bacterias transformadas correspondían con los tamaños esperados, se procedió al aislamiento en gran escala de estos plásmidos (Fig. 11A) para su posterior caracterización mediante un patrón de digestión con enzimas de restricción (Fig. 11B y 11C). El patrón de digestión con la enzima *EcoRI* y las enzimas *BamHI* y *KpnI*, ambas efectuadas a 37°C, correspondió para cada uno de los casos con el patrón de bandas esperado.

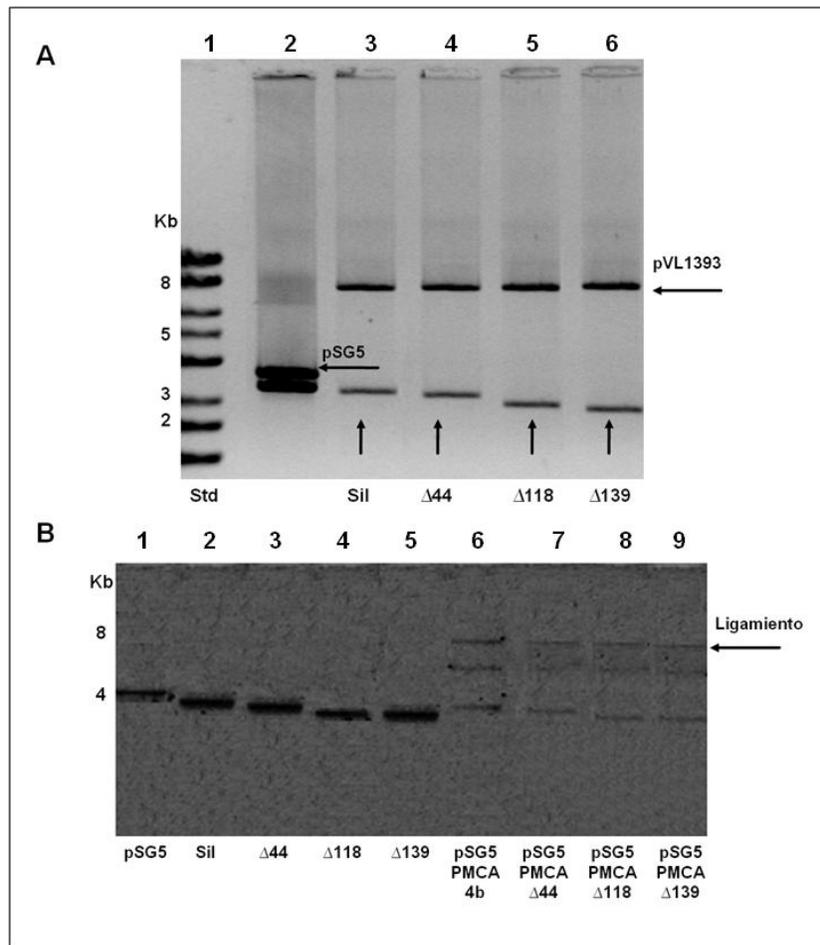


Figura 10. Construcción de los plásmidos pSG5 PMCA4b Silvestre, pSG5 PMCA Δ 44, pSG5 PMCA Δ 118 y pSG5 PMCA Δ 139. **A.** Digestión de pSG5 y pVL1393 Sil, Δ 44, Δ 118 y Δ 139 con *Bam*HI y *Kpn*I, gel de agarosa al 0.8%. **B.** Bandas purificadas del plásmido pSG5 (linearizado) sin inserto y de los insertos para la PMCA Sil, Δ 44, Δ 118 y Δ 139 (carriles 1 al 5) y bandas correspondientes a los productos de ligamiento del pSG5 con los diferentes insertos (carriles 6 al 9), gel de agarosa al 1%. Estándar utilizado de 1kb. Los tamaños aproximados de las bandas corresponden a 4,1 Kb para pSG5, 3,6 Kb para PMCA4b, 3,46 Kb para PMCA Δ 44, 3,2 Kb para PMCA Δ 118, 3,18 Kb para PMCA Δ 139, 7.7 Kb para pSG5-PMCA 4b, 7,56 Kb para pSG5-PMCA Δ 44, 7,34 Kb para pSG5-PMCA Δ 118 y 7,28 Kb para pSG5-PMCA Δ 139 respectivamente.

El patrón de digestión esperado con *Eco*R1 para el plásmido pSG5 PMCA4b (silvestre) es de 3 bandas (4,1, 2,1 y 1,2 Kb) mientras que para las formas truncadas Δ 44, 118 y 139 es de 2 bandas (4,1 y 2,1), ya que en las formas truncadas el sitio de restricción mostrado en la figura como *Eco*RI (4465) desaparece, lo cual genera en estos casos la formación de dos bandas en lugar de las tres correspondientes en el gen de la proteína nativa. Por otra parte, el patrón de digestión de los 4 plásmidos para las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I es de 2 bandas de 4,1 y 3,6 Kb para la enzima silvestre, 2 bandas de 4,1 y 3,46 Kb para la forma truncadas Δ 44, 2 bandas de 4,1 y 3,2 Kb para Δ 118 y 2 bandas

de 4.1 y 3.1 kb para $\Delta 139$. En la figura 11D puede observarse esquemáticamente la ubicación de los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *KpnI* en el plásmido pSG5 con la forma nativa de la PMCA4b.

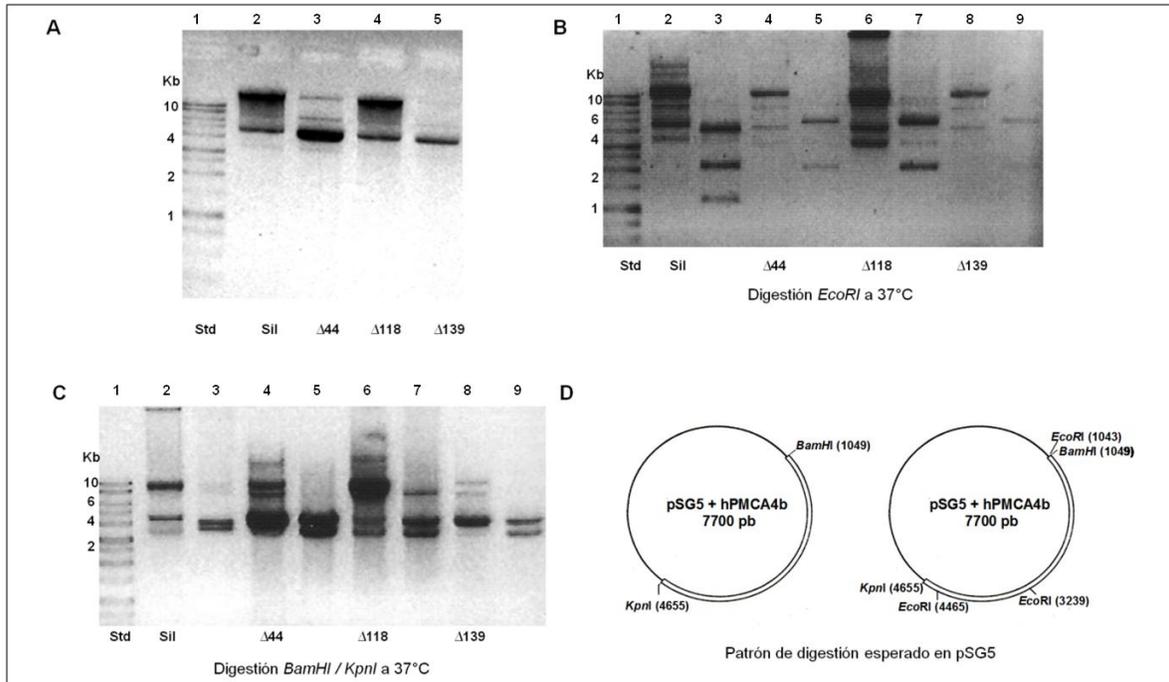


Figura 11. Amplificación a gran escala y caracterización de los plásmidos pSG5 PMCA4b Silvestre pSG5 PMCA $\Delta 44$, pSG5 PMCA $\Delta 118$ y pSG5 PMCA $\Delta 139$. **A.** Amplificación a gran escala de los plásmidos pSG5 sil, $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$. **B.** Digestión enzimática de los plásmidos con *EcoRI*. La digestión con *EcoRI* se realizó a 37°C por 2 horas y media bajo agitación constante. El patrón de bandas esperado para pSG5 sil es de 3 bandas (4.1, 2.1 y 1.2 Kb) (carril 3) mientras que para las formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ es de 2 bandas para cada uno (4.1 y 2.1) (carriles 5, 7 y 9). **C.** Digestión enzimática de los plásmidos con *BamHI* y *KpnI*. La digestión con *BamHI* y *KpnI* se realizó a 37°C por 2 horas y media bajo agitación constante. El patrón de bandas esperado es de 2 bandas de 4.1 y 3.6 Kb para PMCA4b (carril 3). 2 bandas de 4.1 y 3.4 Kb para PMCA4b $\Delta 44$ (carril 5), 2 bandas de 4.1 y 3.2 Kb para PMCA4b $\Delta 118$ (carril 7) y 2 bandas de 4.1 y 3.1 Kb para PMCA4b $\Delta 139$ (carril 9). **D.** Zonas de corte por las enzimas *BamHI*, *KpnI* y *EcoRI* en el plásmido pSG5 con el inserto correspondiente a la PMCA4b silvestre. El gel de agarosa de la figura A es al 0.8% mientras que los geles B y C son al 1%.

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes de interés, procedimos a la estandarización del método de transfección a utilizar. La transfección en las células COS-7 se realizó tanto con lipofectamina como con el método de co-precipitación con Ca^{2+} de manera paralela, no observándose ninguna diferencia con respecto a los niveles de expresión de las proteínas de interés, ni diferencias con respecto a modificaciones o daños morfológicos sobre las células COS-7 transfectadas (datos no mostrados). Debido a esto decidimos transfectar en lo sucesivo con CaCl_2 . Posterior a esto, procedimos a la obtención de fracciones de membrana plasmática de células COS-7 transfectadas y no

transfectadas, estas últimas fueron utilizadas en todos los ensayos como un control ya que las células COS-7 poseen una Ca^{2+} -ATPasa endógena correspondiente a la isoforma PMCA 1a.

La transfección y correcta expresión de la forma nativa y formas truncadas se determinó mediante inmunomarcaje con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática 5F10 y JA3. El anticuerpo monoclonal 5F10 reconoce el segmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 719 y 738, dominio altamente conservado entre todas las isoformas de PMCA. Por su parte el anticuerpo monoclonal JA3, reconoce un dominio exclusivo de la isoforma PMCA4b comprendido entre los residuos aminoacídicos 1156 y 1180. Una vez comprobada la correcta expresión de las proteínas su funcionalidad fue determinada mediante la cuantificación de Pi liberado, siguiendo el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow en 1925.

Los resultados mostrados en la figura 12 permiten corroborar la correcta expresión de la isoforma PMCA4b y sus diferentes formas truncadas. Se puede observar un aumento significativo en el marcaje de las membranas aisladas de las células COS-7 transfectadas con las distintas enzimas con respecto al marcaje de las membranas aisladas de células COS-7 sin transfectar (control) en presencia del anticuerpo 5F10 (Fig.12 A), lo cual nos indica que un mayor número de enzima está siendo expresada luego de la transfección en las membranas plasmática de las células COS-7. En los carriles 5 y 6 de la figura 12 A, se pueden observar, dos bandas de aproximadamente 134 y 120 KDa respectivamente, las cuales corresponden a la isoforma endógena (134 kDa) y a las formas truncadas $\Delta 118$ y $\Delta 139$ (120 y 118 KDa respectivamente). La poca diferencia en tamaño entre la isoforma endógena (PMCA1b), la PMCA 4b nativa así como la forma truncada $\Delta 44$, no permite que con el anticuerpo 5F10 se puedan resolver en el gel la presencia de las dos bandas correspondientes a ambas proteínas, motivo por el cual, se utilizó el anticuerpo JA3, el cual si es exclusivo de la isoforma 4. En la figura 12 B se puede observar que este anticuerpo sólo pudo reconocer bandas proteicas en los carriles correspondientes a fantasmas de eritrocitos humanos y a la PMCA4b nativa expresada, observándose también un tenue reconocimiento en el carril correspondiente a la forma truncada $\Delta 44$ expresada. El poco reconocimiento de este anticuerpo en la forma truncada $\Delta 44$ y la falta de reconocimiento en las formas truncadas $\Delta 118$ y $\Delta 139$ se debe a que, como puede observarse en la Fig 12 C, el epítopo de reconocimiento del anticuerpo JA3 ha sido removido parcial o totalmente en las proteínas truncadas. En la figura 12 C

puede observarse un esquema donde se resaltan los epitopes de los anticuerpos 5F10 y JA3 sobre la PMCA.

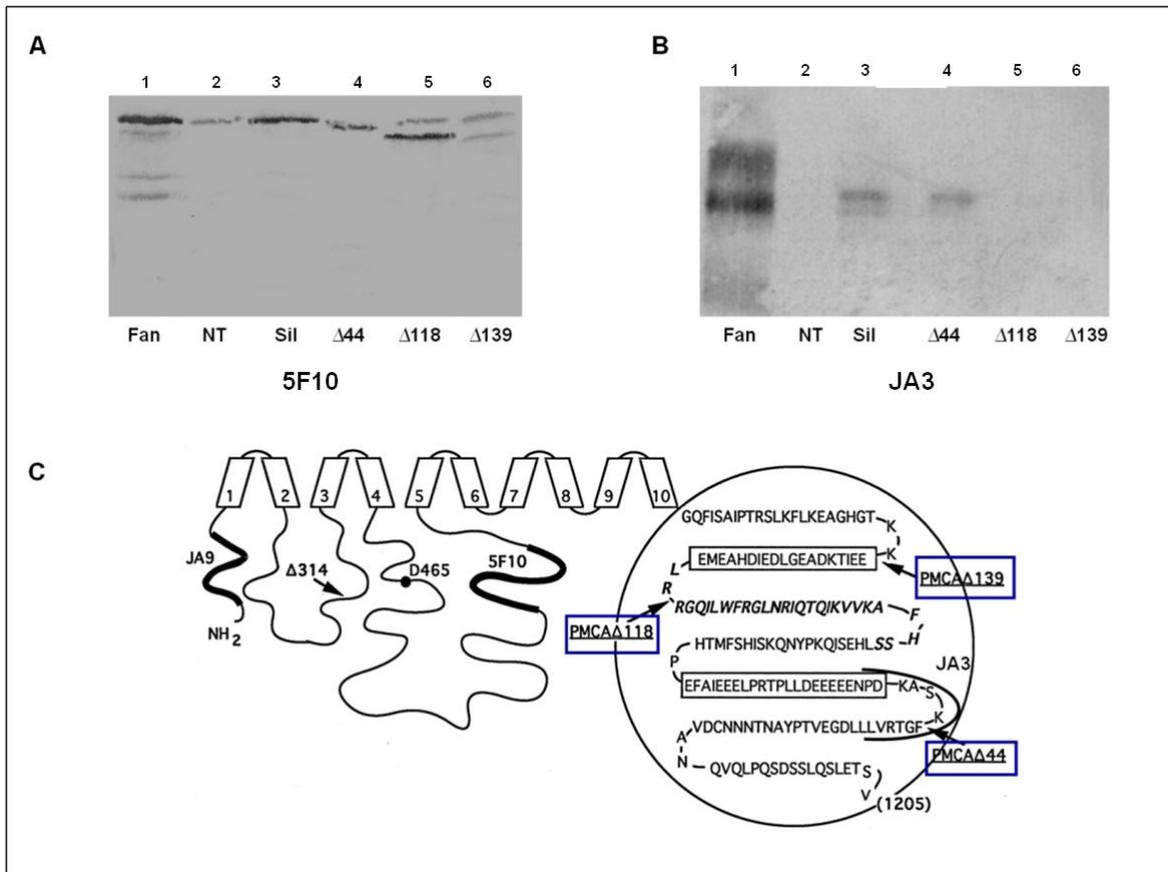


Figura 12. Caracterización inmunológica de la expresión de la PMCA4b y sus formas truncadas en membranas transfectadas de COS-7. **A.** Inmunomarcaje con el anticuerpo monoclonal 5F10 de COS-7 transfectadas y no transfectadas, reveladas con fosfatasa alcalina. **B.** Inmunomarcaje con el anticuerpo monoclonal JA3 de COS-7 transfectadas y no transfectadas, y reveladas con fosfatasa alcalina. **C.** Esquema de la PMCA donde se indican los epitopes de reconocimiento de los anticuerpos 5F10 y JA3, así como los sitios de corte de las diferentes proteínas truncadas utilizadas.

Una vez caracterizada la correcta expresión de las diferentes proteínas procedimos a determinar su funcionalidad. Como puede observarse en la figura 13 A y B se pudo determinar un significativo aumento en la actividad Ca^{2+} -ATPasa en las membranas de células COS-7 transfectadas. La actividad observada en las COS-7 transfectadas con la isoforma nativa PMCA4b muestra un aumento significativo de la actividad basal con respecto a la actividad basal de las COS-7 no transfectadas. La actividad basal de las formas truncada PMCA4bΔ118 y PMCA4bΔ139 fue aproximadamente el doble de la actividad basal de la proteína en su forma nativa, hecho

que corresponde a que estas formas truncadas carecen del dominio autoinhibitorio de CaM, lo que permite que la actividad de las mismas sea similar a la de la enzima silvestre en presencia de CaM. El incremento en la actividad fue observado en la Vmax de la enzima, no mostrándose cambios significativos en su afinidad por el Ca^{2+} en ninguna de las proteínas expresadas estudiadas.

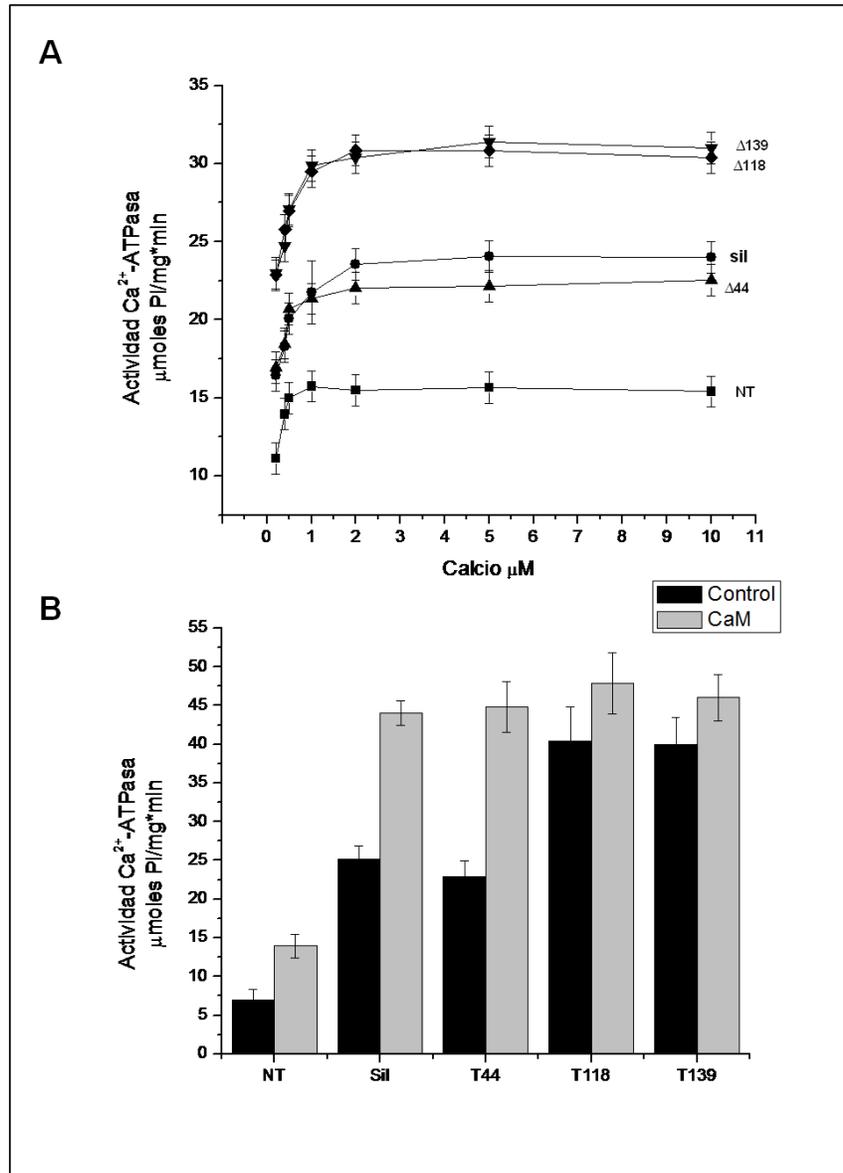


Figura 13. Caracterización funcional de la PMCA4b y sus formas truncadas en el sistema de expresión en COS-7. **A.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en presencia de concentraciones crecientes de Ca^{2+} . **B.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas a una concentración de $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} libre en presencia y ausencia de $5 \mu\text{g/ml}$ CaM. Actividad determinada por el método de Fiske y Subarow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP. Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí y con respecto al control con un $p \leq 0.01$.

Los resultados obtenidos hasta aquí demuestran que los niveles de enzima expresadas en COS-7 permiten determinar la funcionalidad de la enzima expresada en este sistema. Como puede observarse en la figura 13, podemos restar la actividad determinada en las células COS-7 no transfectadas, la cual corresponde a la actividad de la enzima endógena PMCA1a y obtener así la actividad de la isoforma nativa PMCA4b y sus formas truncadas. En la figura 14 se observa la actividad Ca^{2+} -ATPasa en membrana con las diferentes formas expresadas en presencia de $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ y en presencia y ausencia de CaM, una vez restada la actividad de la PMCA endógena. Como puede observarse, solo hay efecto estimulador por parte de CaM en la isoforma nativa y en la truncada $\Delta 44$ mostrándose, para ambos casos, un aumento de la V_{max} de la enzima de aproximadamente el doble con respecto a su control. Dado a que las formas truncadas $\Delta 118$ y $\Delta 139$ carecen del dominio autoinhibitorio de CaM, éstas no son estimuladas por la misma, no observándose así diferencias significativas con respecto a sus controles y mostrando, en ambos casos, actividades basales similares a la actividad de la forma nativa y $\Delta 44$ en presencia de CaM.

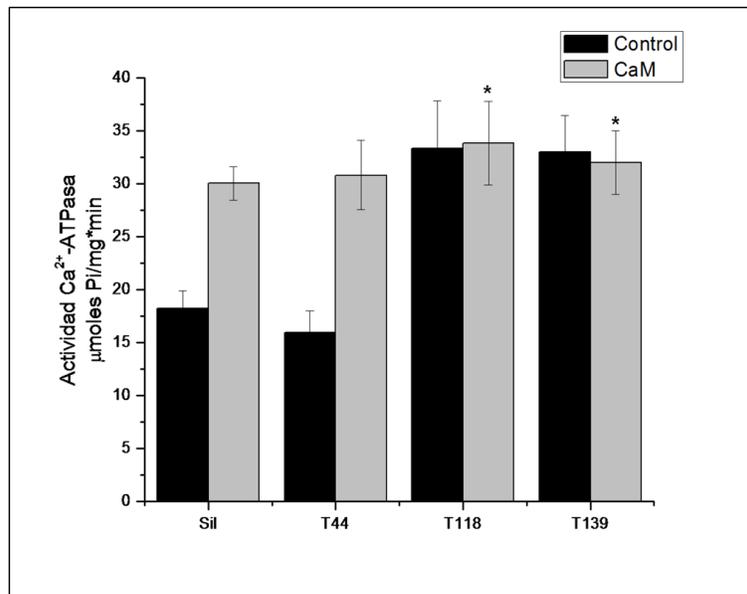


Figura 14. Actividad basal correspondiente a la Isoforma PMCA 4b y formas truncadas expresadas. Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ en presencia y ausencia de $5 \mu\text{g/ml CaM}$. Actividad determinada por el método de Fiske y Subarrow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP . A la Actividad mostrada le fue restada la actividad correspondiente a la PMCA endógena de las células COS-7. Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí con un $p \leq 0.01$ exceptuando las señaladas con * las cuales no difieren de su control.

Los resultados mostrados nos indican claramente que la isoforma PMCA4b y sus tres formas truncadas están siendo correctamente expresadas en el sistema COS y los niveles de enzimas expresadas son suficientes para que la actividad observada en las fracciones de membrana plasmática de COS-7 transfectadas sea significativamente superior a la actividad observada en COS-7 no transfectadas, condición que nos permitirá estudiar los efectos de moduladores de interés sobre la PMCA4b nativa y las diferentes proteínas truncadas en este sistema.

4.1.2. Efecto del Etanol sobre la forma truncada PMCA4b Δ 118 expresada

Una vez demostrada la funcionalidad de las proteínas en nuestro sistema de expresión, procedimos a estudiar el efecto del etanol sobre la forma truncada PMCA Δ 118 y comparar los resultados con los previamente descritos por Cervino y colaboradores en 1998 en las formas truncadas Δ 44 y Δ 139. Para ello, determinamos la actividad Ca²⁺-ATPasa evaluando la cantidad de fosforo inorgánico (Pi) liberado siguiendo el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow en 1925. En la figura 15A, se puede observar que 5% EtOH es la concentración óptima de alcohol para producir una máxima estimulación de la enzima en nuestro sistema. Esta concentración corresponde a la concentración óptima previamente reportada en nuestro laboratorio para la enzima nativa y purificada de eritrocitos humanos (Benaim y col., 1994).

Una vez determinada la concentración de EtOH a utilizar procedimos a estudiar el efecto de este alcohol sobre las enzimas expresadas en nuestro sistema. Como puede observarse en las figuras 15 B y C, 5% etanol induce un aumento en la V_{max} de la enzima endógena y nativa, de aproximadamente el doble. Sin embargo, la actividad basal de la isoforma nativa es significativamente superior a la endógena, tanto en presencia como en ausencia de etanol, lo que nos permite observar el efecto en la proteína expresada.

Por otra parte, sólo se observa un efecto estimulador por parte del etanol en la forma truncada Δ 44, el incremento en la V_{max} de esta enzima fue aproximadamente el doble que la observada en ausencia de EtOH. Tanto la forma truncada Δ 118 como la Δ 139 no presentaron cambios significativos en los niveles de actividad en presencia de EtOH. El hecho de que sus actividades basales sean superiores a la actividad basal de la PMCA nativa es debido únicamente a la falta del dominio de unión de CaM. La diferencia en el efecto estimulador de la forma truncada Δ 44 y Δ 118 por parte del etanol, hace

suponer que los 74 aminoácidos faltantes en esta última son los que participan en la modulación de la enzima por parte del alcohol. Por otra parte, los resultados mostrados en la figura 15 corroboraron los obtenidos por Cervino y colaboradores en 1998 con respecto a las formas truncadas $\Delta 44$ y $\Delta 139$.

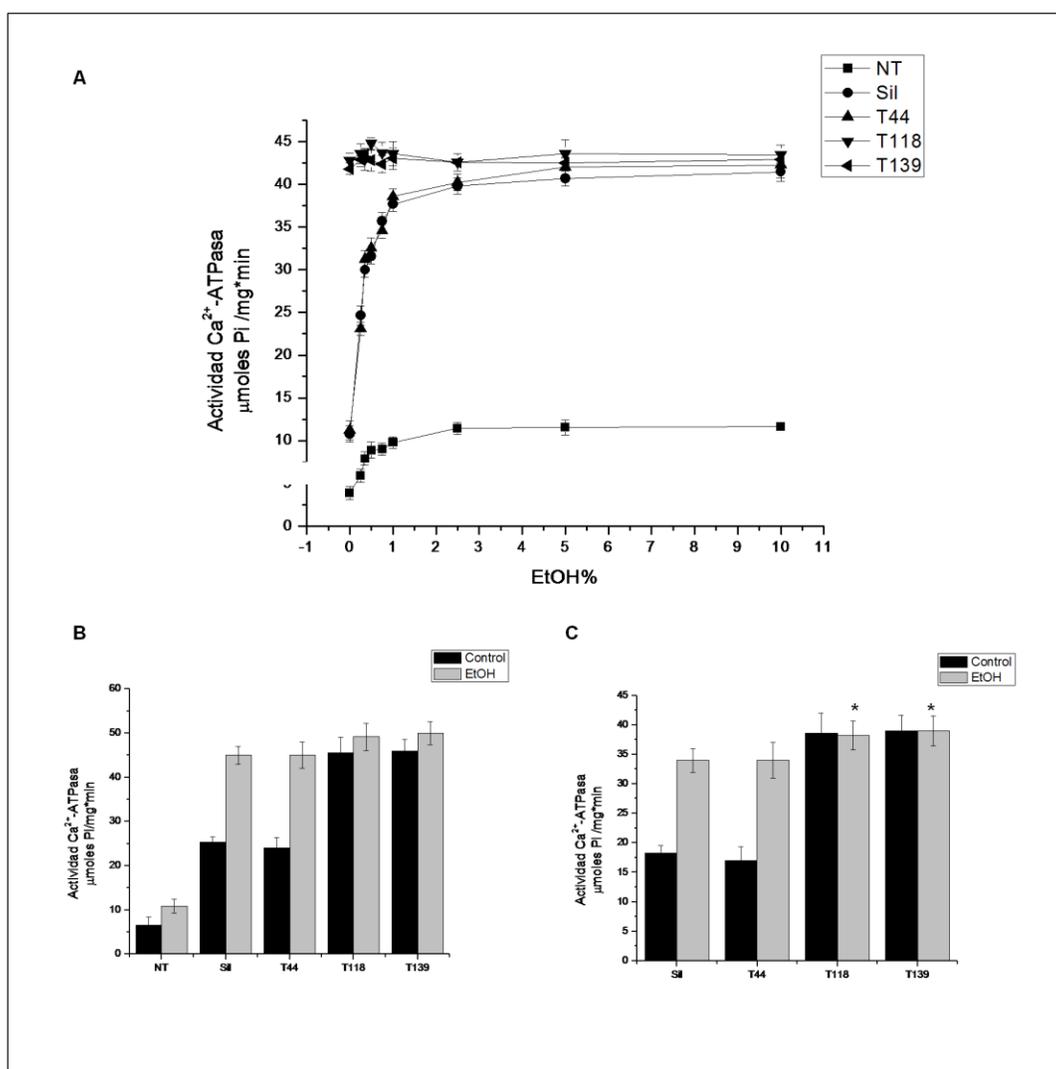


Figura15. Estimulación por ETOH de la isoforma PMCA4b y sus diferentes formas truncadas. A. Actividad Ca^{2+} -ATPasa a concentraciones crecientes de ETOH en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$. **B.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ en presencia y ausencia de ETOH 5%. **C.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas, a la actividad mostrada se le ha restado la actividad endógena de las células COS-7. En todos los casos, la actividad fue determinada por el método de Fiske y Subarrow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP. Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto a su control con un $p \leq 0.01$ exceptuando los grupos identificados con * las cuales no difieren de su control.

Con la finalidad de caracterizar el efecto estimulador del ETOH con respecto al de la CaM. Estudiamos el efecto de ambos moduladores sobre la enzima. Como puede observarse en la figura 16 A y B, el EtOH tiene un efecto aditivo con la CaM sobre la actividad de la enzima nativa y forma truncada $\Delta 44$, mientras que en las formas truncadas $\Delta 118$ y $\Delta 139$ no se observó dicho efecto aditivo. Dado a que en estas últimas la actividad basal simula a la actividad de la enzima nativa en presencia de CaM (al estar ausente el sitio de unión a CaM), se puede sugerir que el dominio C-terminal truncado entre $\Delta 44$ y $\Delta 118$ es el posible dominio donde el EtOH está ejerciendo su efecto estimulador sobre la PMCA. En la figura 16 B es importante resaltar que las actividades mostradas corresponden a la actividad de la enzima expresada pues la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa endógena de las células COS-7 fue restada.

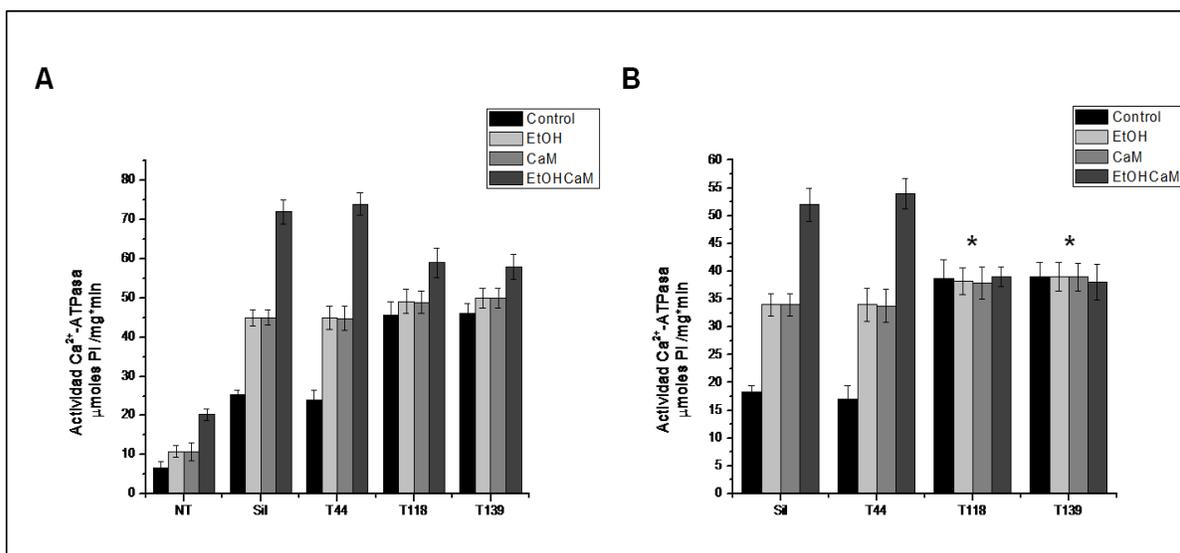


Figura 16. Estimulación de la isoforma PMCA4b y sus diferentes formas truncadas por ETOH y Calmodulina. **A.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia y ausencia de EtOH 5% y $5 \mu\text{g/ml}$ CaM. **B.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas en un medio $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia y ausencia de EtOH 5% y $5 \mu\text{g/ml}$ CaM, a la actividad mostrada se le ha restado la actividad de la PMCA endógena de las células COS-7. Las actividades fueron determinadas por el método de Fiske y Subarrow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP. Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto a su control con un $p \leq 0.01$, exceptuando las señaladas con * las cuales no difieren de su control.

Después de haber demostrado que la forma truncada $\Delta 118$ no es estimulada por el etanol, efecto análogo al demostrado por Cervino y colaboradores en 1998 con respecto a

la forma $\Delta 139$ y una vez establecido que los 74 aa C-terminales presentes en la forma truncada PMCA $\Delta 44$ y ausente en la PMCA $\Delta 118$ corresponde a la región donde se encuentra el posible sitio de interacción del EtOH, procedimos a estudiar la composición aminoácídica (Fig. 17) y el carácter hidrofóbico (Fig. 18) de esta región para estimar su posible interacción con el alcohol. La composición aminoácídica del segmento en estudio lo determinamos con ayuda del programa “*BioLign Alignment and Multiple Pharp Editor*”, mientras que la Hidrofobicidad del segmento fue estudiado con ayuda del programa “*TopPred*”.

La composición del fragmento de 74 aminoácidos puede observarse en la figura 17, donde se destaca una alta proporción de aminoácidos polares como: Lisina (K), Arginina (R) y Ac. Glutámico (E) lo cual sugiere la probabilidad de interacción con la molécula de etanol en esta región. Por otra parte, el carácter hidrofóbico de nuestra secuencia, determinado con el programa “*TopPred*” usando la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle, altamente empleada para la determinación de dominios citosólico o transmembrana en proteínas, donde secuencias con valores superiores a 0 poseen un carácter altamente hidrofóbico, implicando así posibles dominios transmembrana, mostró que nuestra secuencia en la mayoría de su extensión arrojó valores inferiores a 0. Estos resultados sugieren que este segmento de 74 aa está expuesto hacia el citosol, como era de esperarse y por su alta polaridad pudiera interactuar con el alcohol, induciendo de esta manera un aumento en la actividad basal de la enzima.

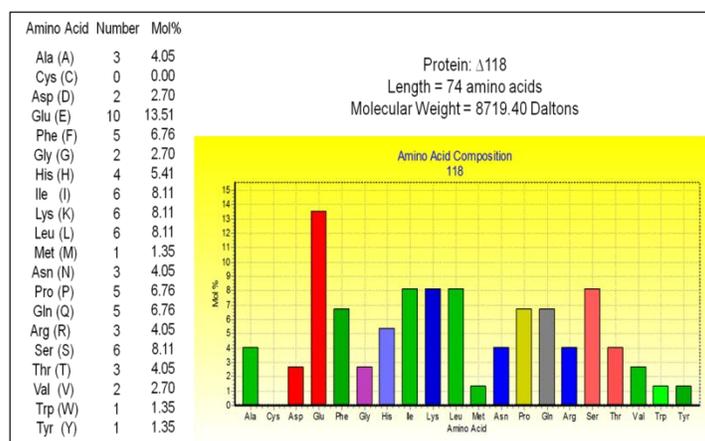


Figura 17. Composición aminoácídica del posible dominio de interacción del etanol en la PMCA4b. Proporción de los aa que constituyen el segmento de 74 aa donde se encuentra el posible sitio de interacción del EtOH con la PMCA. Resultados obtenidos de programa “*BioLign Alignment and Multiple Pharp Editor*”.

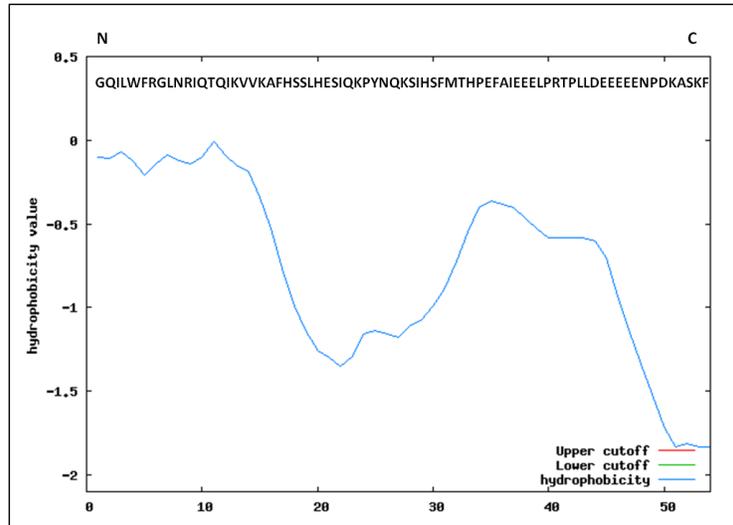


Figura 18 Hidrofobicidad del posible dominio de interacción del EtOH en la PMCA4b. Secuencia de 74 aa eliminada de la PMCA4b Δ 44 sin la cual no se observa estimulación por parte del EtOH y escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle. Valores superiores a 0 indica alta hidrofobicidad. Resultados obtenidos de programa “*TopPred*”.

Una vez determinado el efecto del etanol sobre la isoforma truncada Δ 118 y haber establecido la importancia del segmento de 74 aa C-terminal de la proteína como el posible dominio de interacción del alcohol con la enzima con el alcohol, procedimos a estudiar si el efecto estimulador de segundos mensajeros de origen lipídico como el diacilglicerol y la ceramida, los cuales comparten en su estructura un grupo hidroxilo libre (OH) como el etanol, pudieran compartir el mismo sitio de interacción.

4.1.3. Efecto del Diacilglicerol sobre la actividad de formas truncadas de la isoforma PMCA4b

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática es estimulada por el etanol en forma aditiva con la calmodulina (CaM) (Benaim y col., 1994; Cervino y col., 1998) indicando esto que la enzima podría tener una mayor capacidad de trabajo que la reportada hasta esos momentos. Sin embargo, el etanol no es un efector fisiológico de la enzima, haciéndose necesaria la búsqueda de él o los posibles efectores fisiológicos que pudieran simular la estimulación producida por el etanol “*in vivo*”. Estudios preliminares en nuestro laboratorio, plantearon al diacilglicerol y los esfingolípidos como posibles candidatos (Colina y col., 2002 y Pérez-Gordones y col, 2009). Estos compuestos son moléculas que exponen grupos

hidroxilos libres en sus estructuras (Ganong y col., 1986 y Ohanian y col., 1998) y son considerados de gran importancia en las células ya que están involucrados en diversos mecanismos de señalización celular. Aun cuando nuestros resultados indicaron que estos segundos mensajeros no estimulan a la PMCA al mismo nivel que el etanol, pudimos demostrar la presencia de nuevos moduladores de la enzima que aumentaron su capacidad de trabajo por encima de lo que se había reportado previamente, aumentando de esta manera nuestro conocimiento sobre la compleja regulación de la PMCA.

Por tal motivo decidimos profundizar, en la caracterización del efecto del diacilglicerol (DAG) y la ceramida sobre fracciones de membrana de COS-7 transfectadas con la isoforma nativa PMCA4b y las tres formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ con la finalidad de establecer el posible sitio de interacción entre ellos y la enzima. Nuestra hipótesis inicial era que como estas moléculas tienen un grupo EtOH libre en su estructura, pudieran ejercer su efecto interactuando en la misma región de 74 aa identificada como posible sitio de interacción del EtOH. En la figura 19, se muestra el efecto del DAG sobre la isoforma PMCA4b y las formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$. En la figura 19 A, se puede observar que 20 $\mu\text{g/ml}$ es la concentración óptima de segundo mensajero que induce una máxima estimulación sobre las diferentes enzimas estudiadas. Esta concentración coincide con la previamente reportada por nuestro laboratorio sobre la enzima purificada de eritrocitos humanos (Pérez-Gordones y col., 2009). En la figura también se puede observar que tanto la isoforma endógena, la PMCA4b como las tres formas truncadas son estimuladas por el DAG, indicando con ello que este modulador, a diferencia de lo esperado, posiblemente estaría interactuando con la enzima en una región diferente a los 95 aa ubicados en el extremo C-Terminal de la enzima, donde se encuentran los sitios de interacción del EtOH y la CaM, es decir, el DAG sigue estimulando aún en ausencia del sitio de interacción de la CaM y el del EtOH (Fig. 18 B). El DAG induce un aumento de la V_{max} en cada una de nuestras enzimas de aproximadamente el doble con respecto a su control. Efecto que se mantiene aun cuando es restada la actividad de la PMCA endógena de las células COS-7 (Fig.19 C).

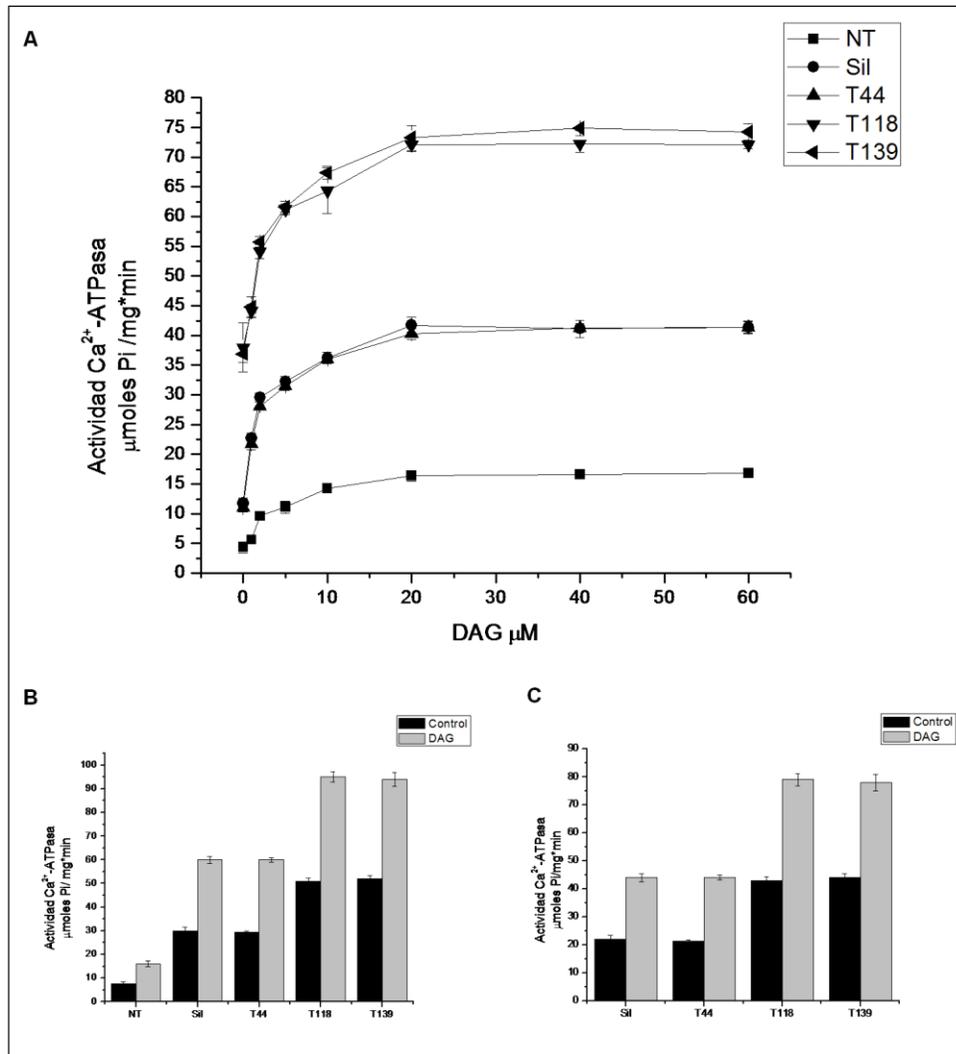


Figura 19. Estimulación de la isoforma PMCA4b y sus formas truncadas por Diacilglicerol. A. Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ en presencia de concentración crecientes de DAG. **B.** Muestra la actividad de la isoforma nativa de la enzima y formas truncadas sin restar la actividad endógena. **C.** Muestra la actividad de la isoforma nativa de la enzima y formas truncadas previamente restada la actividad endógena. Actividad determinada por el método de Fiske y Subarow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP . Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con un $p \leq 0.01$.

En la Figura 20, se determinó el efecto del DAG en presencia de EtOH y CaM. Como puede observarse, una concentración de $20 \mu\text{g/ml}$ de DAG, induce un aumento significativo sobre la actividad basal de la isoforma endógena, PMCA4b así como en las tres formas truncadas, similar al inducido por el etanol (Fig. 20 A y B) y la CaM (Fig. 20 C y D) de manera independiente. También puede observarse el efecto aditivo entre DAG - CaM y DAG -EtOH sobre la actividad máxima de la isoforma silvestre PMCA4b y la forma

truncada $\Delta 44$. Sin embargo, las formas truncadas $\Delta 118$ y $\Delta 139$ no fueron estimuladas por CaM ni por EtOH, ya que los sitios donde interactúan ambos compuestos se encuentran ausentes, observándose sobre ellas únicamente el efecto de DAG.

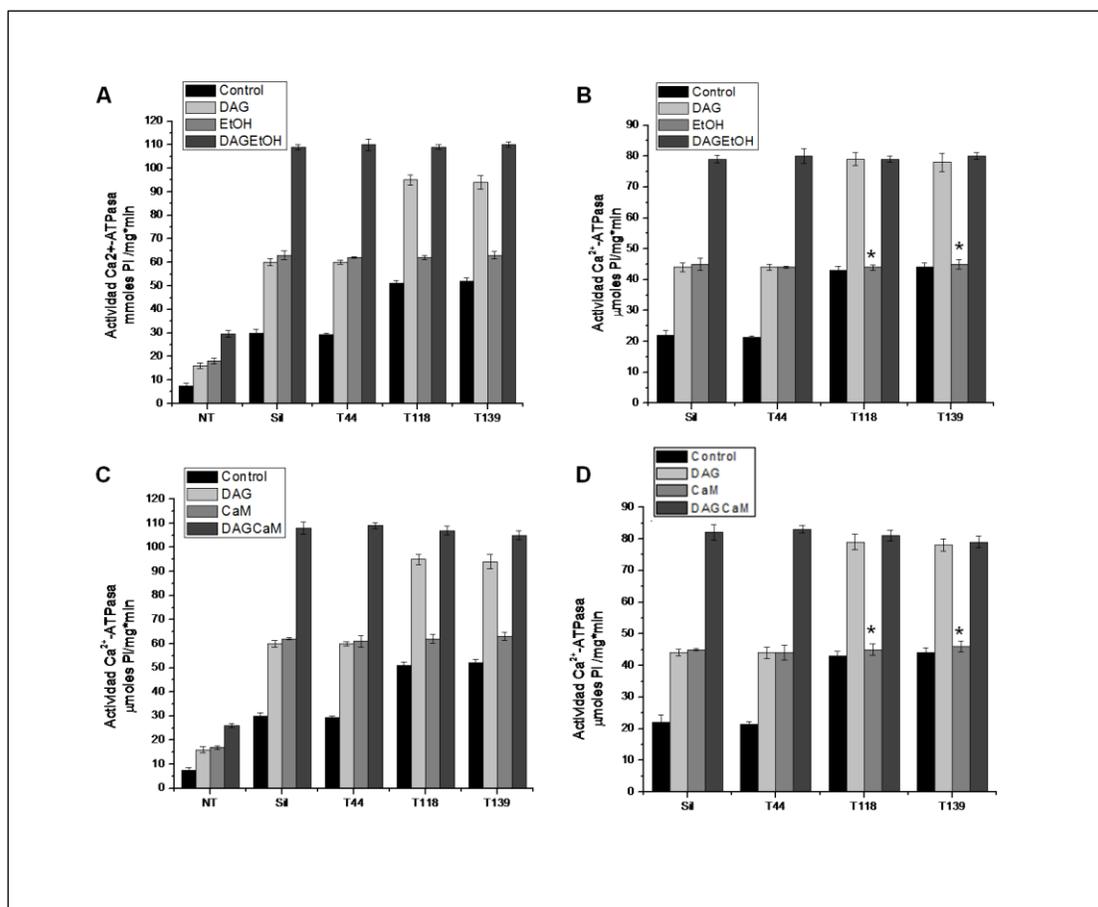


Figura 20. Estimulación de la isoforma PMCA4b y sus formas truncadas por Diacilglicerol, EtOH y CaM. **A.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia y ausencia de DAG $20 \mu\text{g/ml}$, EtOH 5 % y ambos efectores simultáneamente. **B.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia y ausencia de DAG $20 \mu\text{g/ml}$, EtOH 5% y ambos efectores simultáneamente, en este caso, a la actividad mostrada se le ha restado la actividad de la PMCA endógena de las células COS-7. **C.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia y ausencia de DAG $20 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$ CaM y ambos efectores simultáneamente. **D.** Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membrana de células COS-7 transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia y ausencia de DAG $20 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$ CaM y ambos efectores simultáneamente, en este caso, a la actividad mostrada se le ha restado la actividad de la PMCA endógena de las células COS-7. La Actividad fue determinada por el método de Fiske y Subarrow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP. Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con un $p \leq 0.01$ exceptuando las señaladas con *.

Los resultados mostrados en las figuras 19 y 20, sugieren que el DAG interactúa con la isoforma PMCA4b en una región o dominio diferente al del etanol, pues las formas truncadas $\Delta 118$ y $\Delta 139$, las cuales no son estimuladas por etanol pues tienen ausente el dominio de 74 aa previamente establecido como posible región de interacción de este alcohol, presentaron un significativo aumento de sus actividades basales en presencia del DAG.

Otro de los moduladores estudiados en el laboratorio, en búsqueda de un sustituto fisiológico del etanol fue la ceramida, importante segundo mensajero involucrado en procesos de proliferación celular. Colina y colaboradores en el 2002 determinaron que una concentración de 10 μM de ceramida es capaz de inducir un aumento significativo en la actividad de la enzima. Sin embargo, dicha estimulación no alcanza los niveles de actividad inducidos por el etanol. Estos resultados fueron bien interesantes pues a pesar que indicaron que la ceramida no es el sustituto fisiológico del etanol, se propone como otro modulador fisiológico de la enzima. Por tal motivo, resulta interesante estudiar el posible sitio de interacción de la ceramida y posible mecanismo de acción de este compuesto sobre la enzima, así como establecer también si el DAG y la ceramida pudieran tener un efecto similar sobre la enzima y compartir un mismo mecanismo de acción. Para ello, profundizamos en el estudio del efecto de la ceramida sobre las diferentes formas truncadas de la isoforma PMCA4b.

4.1.4. Efecto de la ceramida sobre la actividad de formas truncada de la isoforma PMCA4b

Como puede observarse en la figura 21 A, la concentración óptima de ceramida en nuestro sistema fue de 10 μM , concentración reportada anteriormente en nuestro laboratorio como óptima para la PMCA purificada de eritrocitos humanos (Colina y col., 2002). En esta figura, se puede observar que la ceramida es capaz de estimular tanto a la PMCA endógena, la PMCA4b silvestre como a las tres formas truncas utilizadas en este estudio. Por otra parte, en las figuras 21 B y C se puede observar que la ceramida induce un efecto similar al del DAG sobre las isoforma endógena, PMCA4b nativa y las formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$, observándose para cada uno de los casos un aumento significativo de la V_{max} de estas enzimas con respecto a sus controles. La figura 21 B muestra que aun cuando hay un aumento sobre la actividad de la isoforma endógena, éste es significativamente inferior al observado en las membranas de las células COS-7 transfectadas, permitiendo así estudiar el efecto de este compuesto sobre las formas de

las enzima expresadas (Fig. 21 C). Al igual que lo ocurrido con el DAG, la ceramida estimuló a las formas truncadas $\Delta 118$ y $\Delta 139$, las cuales no son estimuladas por el EtOH al no estar presente su posible sitio de interacción (Fig. 21 A y C), sugiriendo así que el sitio de interacción de la ceramida con la enzima es diferente al sitio de interacción del EtOH.

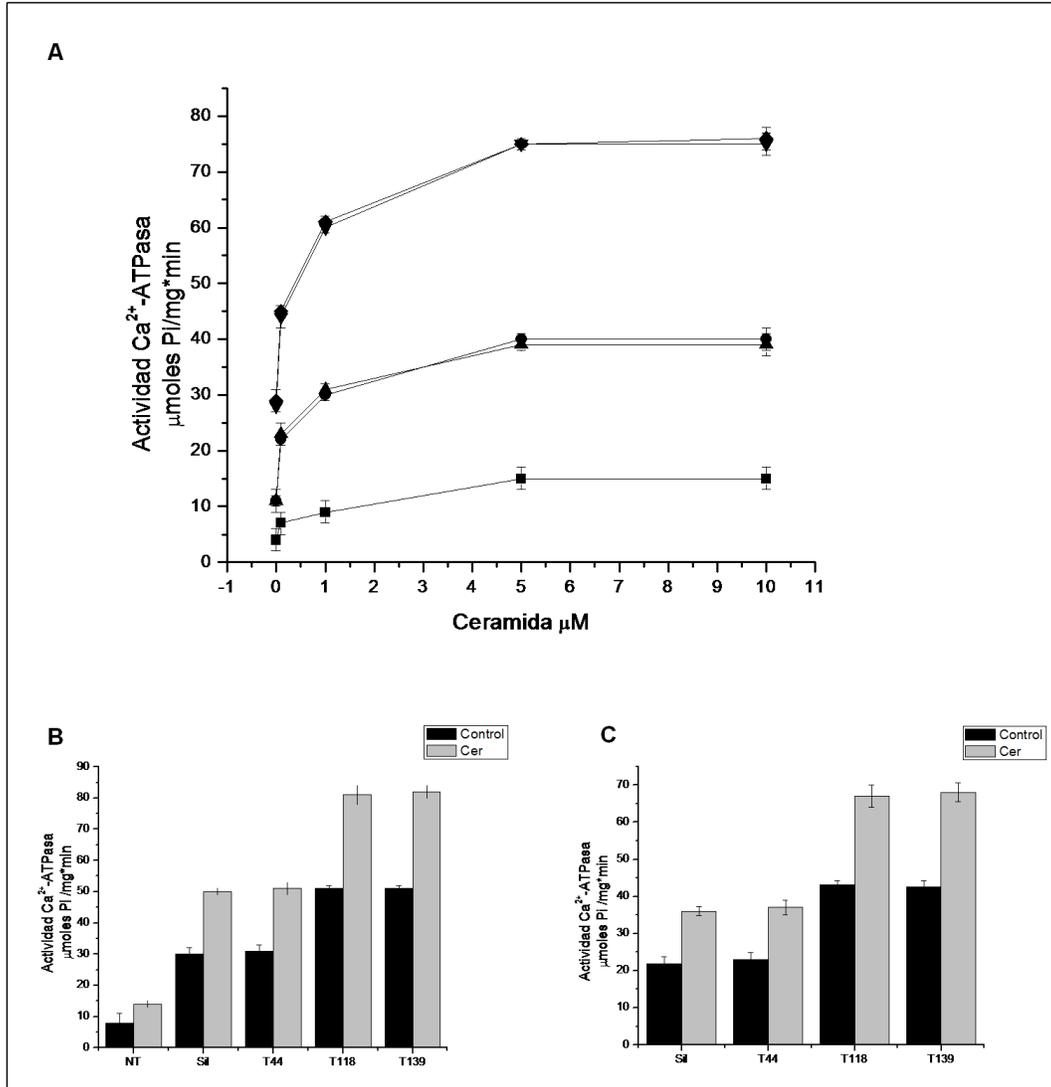


Figura 21. Estimulación de la isoforma PMCA4b y sus formas truncadas por Ceramida. A. Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia de concentraciones creciente de ceramida. B. Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia y ausencia de ceramida $10 \mu\text{M}$. C. Actividad Ca^{2+} -ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas en un medio con $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} en presencia y ausencia de ceramida $10 \mu\text{M}$, en este caso a la actividad mostrada se le ha restado la actividad endógena de las células COS-7. La actividad fue determinada por el método de Fiske y Subarrow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP. Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto a su control con un $p \leq 0.01$.

Así como ocurrió con el diacilglicerol, en la figura 22 puede observarse, que existe aditividad de la ceramida con la CaM, modulador proteico natural de la PMCA y con el EtOH, sugiriéndonos así esto, que de alguna manera se está dando un comportamiento o mecanismo de acción similar para el DAG y la ceramida.

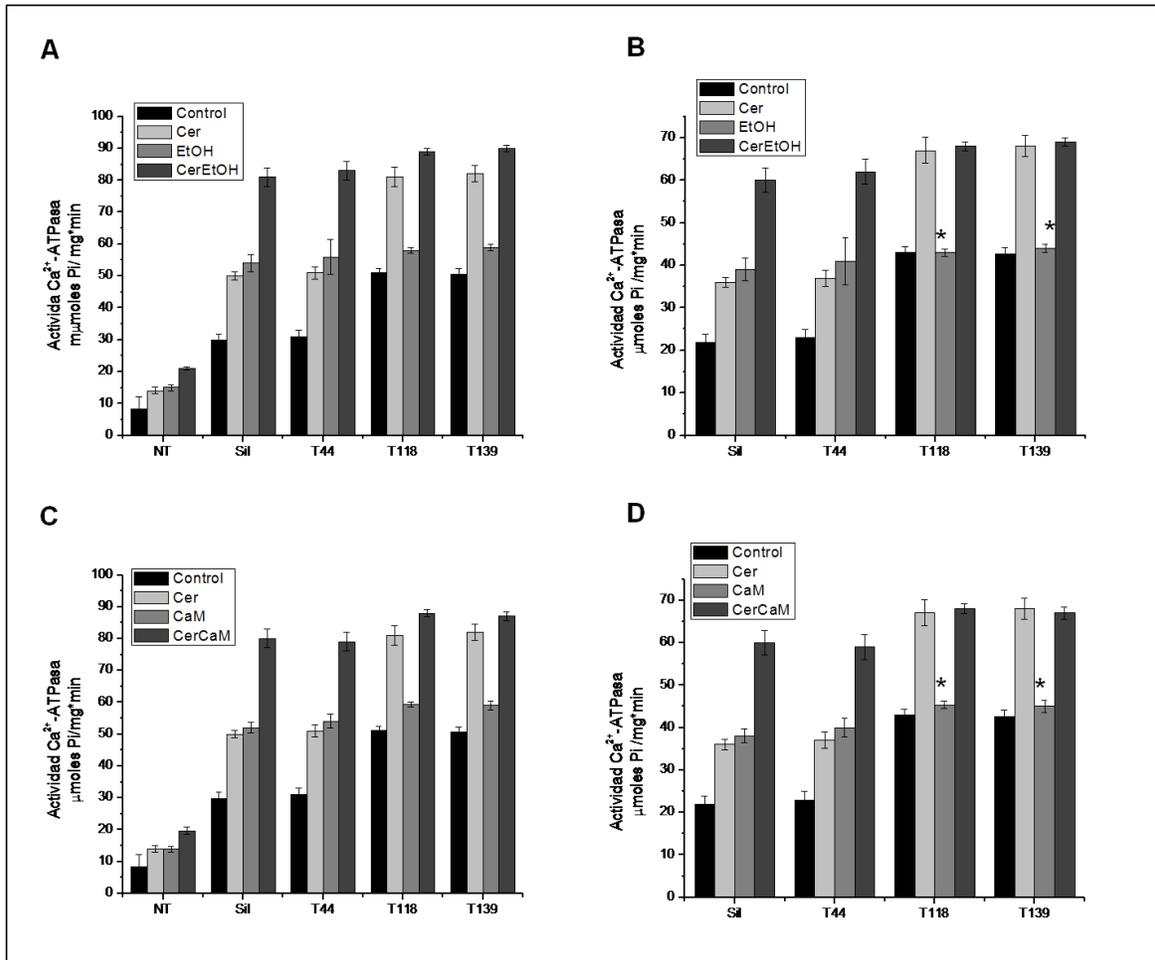


Figura 22. Estimulación de la isoforma PMCA4b y formas truncadas de la enzima por Ceramida, Etanol y Calmodulina. **A.** Actividad Ca²⁺-ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con 10 μM Ca²⁺ en presencia y ausencia de Ceramida 10 μM, EtOH 5% y ambos efectores simultáneamente. **B.** Actividad Ca²⁺-ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas en un medio con 10 μM Ca²⁺ en presencia y ausencia de Ceramida 10 μM, EtOH 5% y ambos efectores simultáneamente, a la actividad mostrada se le ha restado la actividad endógena de las células COS-7. **C.** Actividad Ca²⁺-ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas y no transfectadas en un medio con 10 μM Ca²⁺ en presencia y ausencia de Ceramida 10 μM, 5 μg/ml CaM y ambos efectores simultáneamente. **D.** Actividad Ca²⁺-ATPasa en membranas de células COS-7 transfectadas en un medio con 10 μM Ca²⁺ en presencia y ausencia de Ceramida 10 μM, 5 μg/ml CaM y ambos efectores simultáneamente, a la actividad mostrada se le ha restado la actividad endógena de las células COS-7. La actividad fue determinada por el método de Fiske y Subarrow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP. Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto a su control con un p ≤ 0.01 exceptuando las señaladas con *.

Los resultados mostrados hasta este momento nos sugieren que tanto la Ceramida como el Diacilglicerol modulan a la Ca^{2+} -ATPasa a través de mecanismos diferentes al del etanol, indicando de esta manera, que el dominio de 74 aminoácidos C-terminal faltante entre las formas truncada $\Delta 44$ y la $\Delta 118$ así como los 21 aa adicionales, faltantes en la forma truncadas $\Delta 139$, no participan de manera directa en la modulación inducida por parte de estos segundos mensajeros. Buscando otras posibles regiones, en la Ca^{2+} -ATPasa, donde podrían estar interactuando el DAG y la ceramida nos basamos en regiones que habían sido previamente descritas para la interacción de lípidos acídicos que regulan a esta enzima (Tezanos Pinto y Adamo., 2002; Zvaritch y Colaboradores en 1990 y Brodin y col., 1992). Estos autores reportaron dos regiones de interacción de lípidos con la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, el primero de ellos ubicado en el primer "loop" citoplasmático entre los dominios transmembrana M2 y M3 (Zvaritch y Colaboradores, 1990) y el segundo ubicado en la misma región de unión a CaM (Brodin y col., 1992). Dado a que nuestros resultados mostraron un efecto estimulador por parte del DAG y la ceramida en las formas truncadas que carecen del dominio de unión a CaM podríamos suponer que estos moduladores, podrían estar interactuando con la enzima en el dominio descrito por Zvarich y colaboradores, por lo que nos concentramos en caracterizar la posible interacción del DAG y la Ceramida con esta última región descrita.

En este sentido, quisimos determinar si el DAG y la ceramida pudieran estar compartiendo un mismo mecanismo de acción con algún fosfolípido ácido que interactuara en el dominio descrito por Zvarich y col en 1990, siendo así se podría demostrar que la interacción de estos segundos mensajeros con la enzima se da en el dominio de unión a fosfolípidos ácidos presente en el primer dominio citosólico entre los dominios transmembrana M2 y M3. Tomando en cuenta esto, profundizamos en el estudio del efecto de estos segundos mensajero en presencia y ausencia de Fosfatidilserina, uno de los fosfolípidos ácidos reportado que interactúa en la región propuesta por Zvarich y colaboradores. Para ello, procedimos a estudiar esta modulación directamente sobre la enzima purificada a partir de eritrocitos humanos, para de esta manera evitar una posible estimulación por parte de los lípidos presentes en la membrana plasmática de las enzimas expresadas.

Como puede observarse en la figura 23, el DAG y la Ceramida inducen un aumento sobre la V_{max} de la PMCA purificada similar al inducido por la fosfatidilserina (PS). Por otra parte, no se observa aditividad entre DAG y Ceramida, DAG y PS ni entre

Ceramida y PS. Sin embargo, el efecto independiente de estos moduladores si es aditivo a CaM.

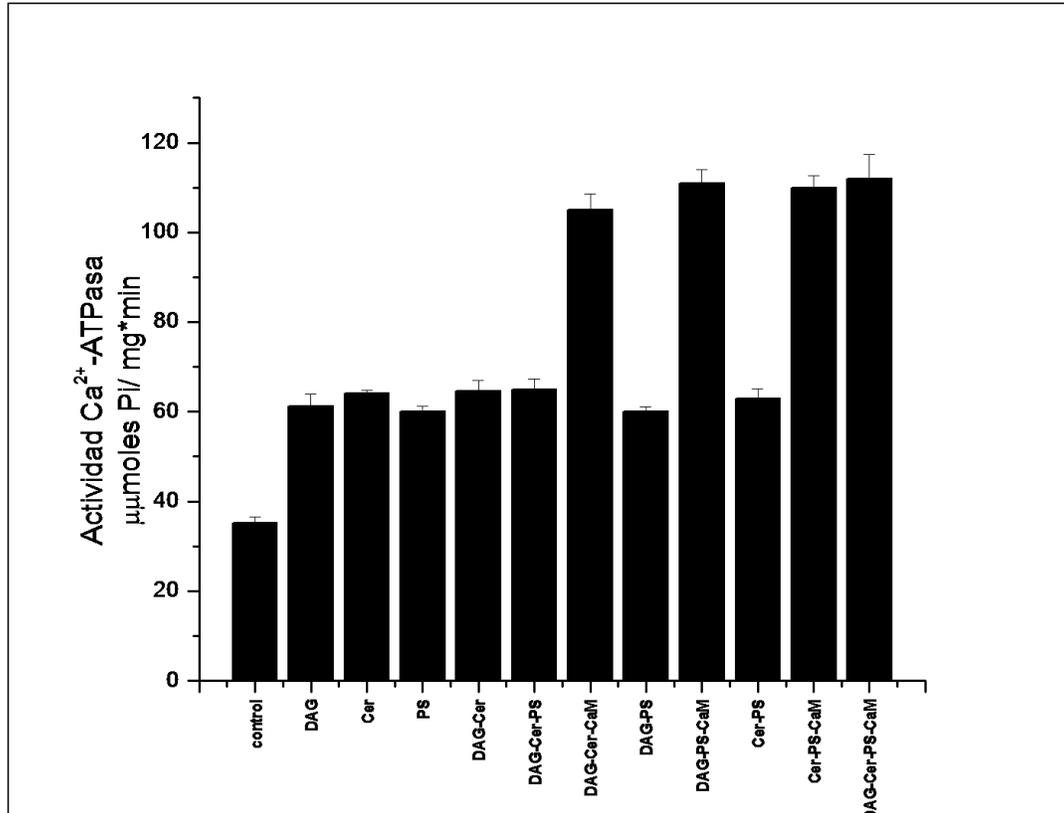


Figura 23. Estimulación de la Ca²⁺-ATPasa Purificada de eritrocitos humanos por Diacilglicerol, Ceramida y Fosfatidilserina Actividad Ca²⁺-ATPasa purificada en un medio con 10 μM Ca²⁺ en presencia y ausencia de DAG 20 μg/ml, Ceramida 10 μM, Fosfatidilserina 20 μg/ml, CaM 5 μg/ml y combinaciones de los moduladores mencionados. La Actividad fue determinada por el método de Fiske y Subarow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP. Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente con respecto al control con un $p \leq 0.01$.

4.2. Caracterización fisiológica, molecular, inmunológica y bioquímica de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca²⁺ en *Trypanosoma evansi*

Con la finalidad de profundizar en el estudio de la homeostasis de Ca²⁺ en tripanosomatidios, en esta parte de nuestro trabajo nos hemos propuesto como objetivo evidenciar, identificar y caracterizar proteínas involucradas en el transporte de este catión en *Trypanosoma evansi*, mediante métodos fisiológica, moleculares, inmunológicos y bioquímicos.

4.2.1. Evidencias fisiológicas de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*

Como primera aproximación, nos propusimos evidenciar fisiológicamente la presencia de los sistemas de transporte de Ca^{2+} , mediante el uso de inhibidores clásicos específicos, como Tapsigargina (Tg), Hidroxibutilhidroquinona (BHQ), Acido Ciclopiazónico (CPA) y 2- Aminoetoxidifenil borato (2APB), listados en la tabla 9, los cuales han sido descritos en la literatura y empleados con este fin en eucariotas incluyendo a los tripanosomatídios.

Tabla 9. Inhibidores de mecanismos de transporte de Ca^{2+}

Inhibidor	Blanco	Referencia en eucariotas	Referencia en parásitos
Tg	Ca^{2+} -ATPasa Tipo SERCA	Inesi y col. 2005	Mendoza y col., 2004 Stojdj y Clarke, 1996 Nolan y col., 1994 Docampo y col., 1993 Vercesi y col., 1993
BHQ	Ca^{2+} -ATPasa Tipo SERCA	Paula, S. y col., 2009	Cardi y col., 2010
CPA	Ca^{2+} -ATPasa Tipo SERCA	Seider y col., 1989	Furuya y col., 2001
2APB	Canales de Ca^{2+} operado por vaciado de reservorios	Bootman y co., 2002	-

4.2.1.1. Evaluación del efecto de los inhibidores específicos de SERCA sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular mediante microespectrofluorometría en parásitos cargados con FURA-2AM

Para explorar la capacidad de *T. evansi* de mantener su concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) constante y evidenciar la presencia de los sistemas de transporte de Ca^{2+} asociados, se determinó $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en solución Tyrode normal (2 mM CaCl_2) y se procedió a explorar los cambios que podrían ocasionar la incubación con los diferentes inhibidores específicos de SERCA sobre este parámetro en el tiempo.

En la figura 24 A, B y C, se muestran experimentos típicos, en los cual después de obtenerse la línea basal estable de alrededor de 100 nM, correspondiente a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones fisiológicas (Tyrode normal), se incubaron los parásitos con 1 μM Tg (A), 25 μM BHQ (B) y 50 μM CPA (C). Los primeros dos tratamientos produjeron un pequeño aumento, de alrededor a 30 nM, en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} extracelular (Tyrode 0 Ca^{2+} + 10 μM EGTA). Este pequeño efecto producido por los inhibidores de SERCA, Tg y

BHQ, en un medio libre de Ca^{2+} , sugieren la existencia de un reservorio de calcio de baja capacidad, en el cual, el almacenamiento de Ca^{2+} es dependiente de la actividad de SERCA, la cual es sensible a bajas concentraciones de Tg y BHQ, e insensible a CPA.

En la misma figura, también se puede observar que cuando el medio extracelular se lleva a una concentración final de 2mM Ca^{2+} , la Tg y el BHQ producen un incremento rápido y marcado de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figuras 24 A y B), de aproximadamente 200nM, el cual se decrece en el tiempo, observándose un marcado cambio en la pendiente del trazo. Este comportamiento sugiere el cese del efecto y una disminución lenta y progresiva de los niveles de Ca^{2+} intracelulares por la activación de otros mecanismos involucrados en la homeostasis del Ca^{2+} en *T. evansi*, posiblemente la PMCA y la V- Ca^{2+} -ATPasa entre otros, los cuales pueden actuar para controlar el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido.

Contrariamente, en la parte C de la figura 24, se puede observar que el inhibidor de SERCA CPA, no produjo ningún efecto sobre los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, ni en ausencia o presencia de Ca^{2+} extracelular.

Con la finalidad de explorar si la Tg y el BHQ actúan sobre el mismo reservorio y afectan igualmente los mecanismos involucrados en la homeostasis de Ca^{2+} , se procedió a evaluar el efecto aditivo de estos inhibidores entre sí. En la figura 25A, se observa que la adición al medio de 1 μM Tg no tiene ningún efecto luego del aumento producido en los niveles de Ca^{2+} por la adición de 25 μM BHQ, en presencia de Ca^{2+} extracelular. Similarmente, la adición de BHQ (fig. 25B) no produce sino un pequeño incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sugiriendo que a esta concentración de BHQ, este podría actuar no solo sobre SERCA, sino inespecíficamente sobre otro mecanismo involucrado en la homeostasis de Ca^{2+} .

Concentraciones menores de BHQ no producen efecto sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular en *T. evansi* (resultados no mostrados).

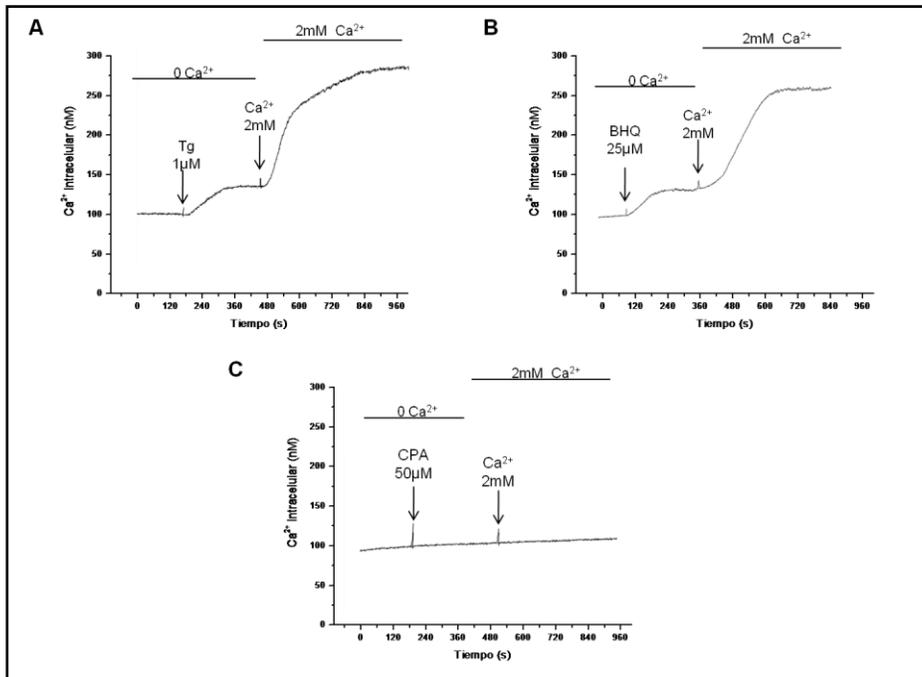


Figura 24. Efecto de la Tapsigargina, Benzohidroquinona y Acido ciclopiazonico sobre la concentración citosólica de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*. **A.** Efecto de Tapsigargina sobre la concentración citosólica de Ca^{2+} en parásitos entero cargados con FURA 2AM en un medio libre de calcio. Pasados 500s desde el inicio del ensayo, se le incrementa la concentración final de CaCl_2 del medio a 2mM. **B.** Efecto de BHQ 25 μM sobre la concentración citosólica de Ca^{2+} en parásitos entero cargados con FURA 2AM en un medio libre de calcio. Pasados 500s desde el inicio del ensayo, se le incrementa la concentración final de CaCl_2 del medio a 2mM. **C.** Efecto del acido ciclopiazonico 50 μM sobre la concentración citosólica de Ca^{2+} en parásitos entero cargados con FURA 2AM en un medio libre de calcio. Pasados 450s desde el inicio del ensayo. En todos los ensayos, los parásitos fueron cargados con una concentración final de FURA de 2 μM . La concentración de calcio se calculo mediante la ecuación de Grynkiewicz y col. (1985)

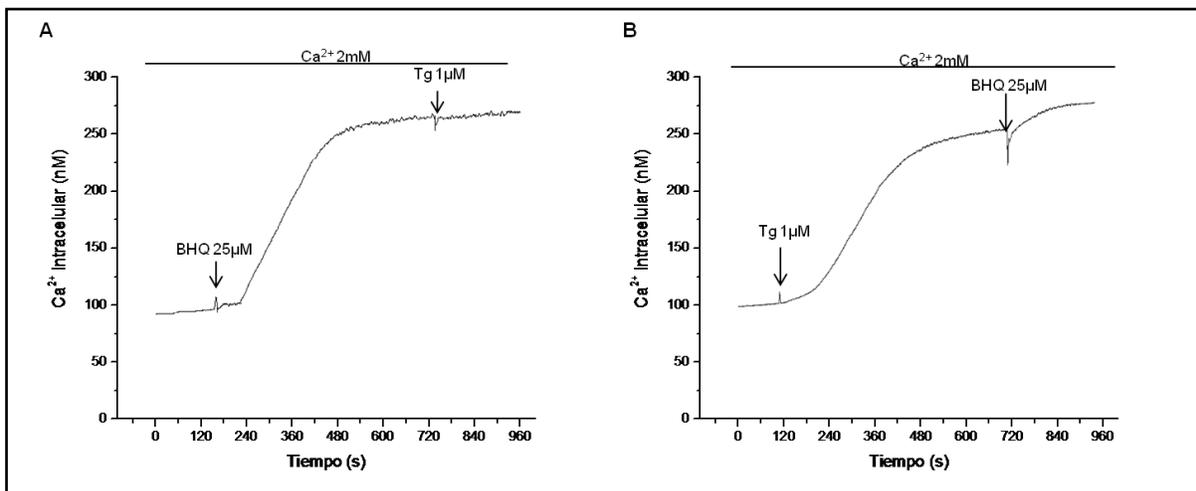


Figura 25. Efecto aditivo de tapsigargina y benzohidroquinona sobre la concentración citosólica de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*. **A.** Efecto de Tg 1 μM y BHQ 25 μM sobre la concentración citosólica de Ca^{2+} en parásitos entero cargados con FURA 2AM en un medio contentivo de 2mm CaCl_2 . **B.** Efecto de BHQ 25 μM y Tg 1 μM sobre la concentración citosólica de Ca^{2+} en parásitos entero cargados con FURA 2AM en un medio contentivo de 2mm CaCl_2 . Los parásitos fueron cargados con una concentración final de FURA de 2 μM . La concentración de calcio se calculo mediante método de Grynkiewicz y col. (1985)

Estos resultados sugieren que la Tg y el BHQ actúan sobre el mismo mecanismo de transporte de Ca^{2+} , la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplasmático SERCA. La inhibición de esta bomba ocasiona un aumento considerable de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, dependiente de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, posiblemente a través de la entrada de Ca^{2+} mediante un canal de Ca^{2+} situado en la membrana plasmática, activado por el vaciado del depósito de calcio intracelular, probablemente un canal del tipo SOC.

4.2.1.2. Evaluación del inhibidor 2APB sobre el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por taspigargina y benzohidroquinona en presencia de Ca^{2+} extracelular.

Con la finalidad de explorar el mecanismo de transporte involucrado en el efecto producido por Tg y BHQ en presencia de Ca^{2+} extracelular, se evaluó el efecto del 2-Aminoetoxidifenil borato (2-APB), conocido inhibidor de canales de calcio tipo SOC.

Como se puede observar en la figura 26 A y C, la incubación primero de los parásitos con $50\mu\text{M}$ 2APB disminuye notablemente el efecto producido por la adición de $1\mu\text{M}$ Tg y $25\mu\text{M}$ de BHQ al medio en presencia de Ca^{2+} . Nótese que los pequeños aumentos producidos, de aproximadamente 30 nM, son similares a los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en un medio libre de Ca^{2+} , probablemente debido a la liberación del Ca^{2+} almacenado en el RE. De la misma manera, la adición de $50\mu\text{M}$ 2APB luego de la Tg o el BHQ en presencia de Ca^{2+} (fig. 26 B y D) produce un cambio drástico en la pendiente del trazo, lo cual posiblemente implica la inhibición de la entrada de Ca^{2+} . Estos resultados nos permiten evidenciar la posible presencia de un canal de Ca^{2+} tipo SOC en *T. evansi*.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de otros inhibidores de los canales de calcio como BTP2 y miltefosina los cuales no lograron inhibir el efecto causado por Tg y BHQ en presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular (resultados no mostrados).

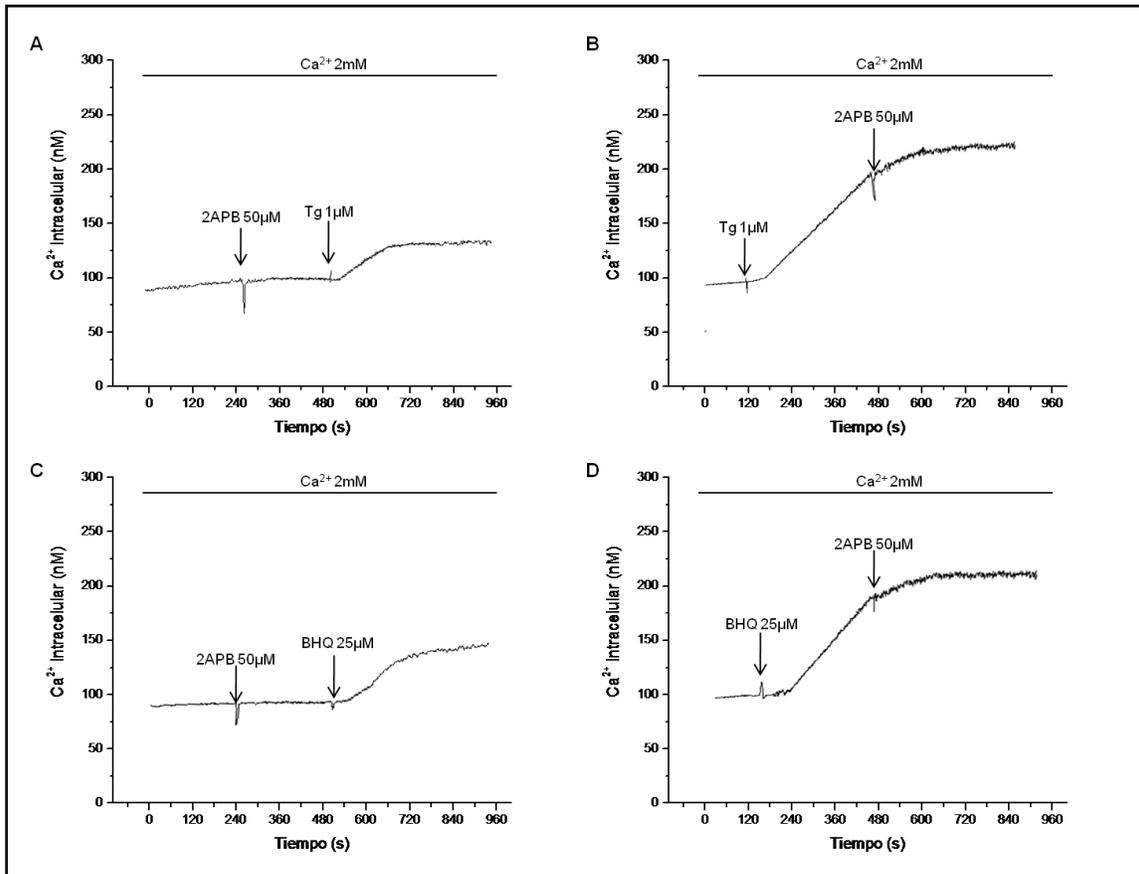


Figura 26. Efecto de 2APB sobre la concentración citosólica de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*. **A.** Efecto de 2APB 50 μM y Tg 1 μM sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en parásitos enteros cargados con FURA 2AM en un medio contentivo de 2mM CaCl_2 . **B.** Efecto de Tg 1 μM y 2APB 50 μM sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en parásitos enteros cargados con FURA 2AM en un medio contentivo de 2mm CaCl_2 . **C.** Efecto de 2APB 50 μM y BHQ 25 μM sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en parásitos enteros cargados con FURA 2AM en un medio contentivo de 2mm CaCl_2 . **D.** Efecto de BHQ 25 μM y 2APB 50 μM sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en parásitos enteros cargados con FURA 2AM en un medio contentivo de 2mm CaCl_2 . Los parásitos fueron cargados con una concentración final de FURA de 2 μM . La concentración de calcio se calculó mediante método de Grynkiewicz y col. (1985)

4.2.2. Evidencias moleculares de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca²⁺ en *Trypanosoma evansi*

4.2.2.1. Identificación molecular de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca²⁺ en *Trypanosoma evansi*.

Hasta el momento, los resultados obtenidos nos han permitido evidenciar fisiológicamente la presencia de proteínas claves implicadas en la homeostasis de Ca²⁺ en *T. evansi*. Por lo tanto, en esta parte del trabajo, nos hemos propuesto evidenciar, identificar y caracteriza de manera molecular, a estas proteínas en el genoma de *T. evansi*. Para ello, basándonos en las secuencias descritas en la literatura, para las proteínas involucradas en el transporte y regulación del Ca²⁺ en *Trypanosoma brucei*, procedimos a diseñar una serie de oligos que nos permitieron amplificar mediante PCR dichos genes.

Selección de las posibles Ca²⁺-ATPasa en el genoma de *Trypanosoma brucei* y identificación de los dominios característicos para las Ca²⁺ ATPasas

Como primera aproximación, nos basamos en la homología existente entre *T. evansi* y *T. brucei*, para identificar las posibles Ca²⁺-ATPasas involucradas en la homeostasis de Ca²⁺ en *T. evansi*. Por lo tanto, realizamos una búsqueda en el genoma de *Trypanosoma brucei* 927, en la base de datos de GeneDB (www.Sanger.ac.uk/projects/t.brucei) mediante un BLAST, de las secuencias aminoacídicas de los dominios altamente conservados (DC) en las proteínas de la familia de ATPasa del tipo P (Tabla 4), los cuales están presentes en todas las Ca²⁺-ATPasas. Mediante este procedimiento se obtuvo una lista de proteínas que presentan los DC seleccionados, las cuales se muestran en la tabla 10. En esta tabla se presentan las 10 secuencias con mayor puntaje de BLAST o "score", y valores de P(N) cercanos a 1. Estos parámetros indican una mayor probabilidad de que la secuencia del DC se encuentra en la proteína identificada, resaltando en color rojo las secuencias que comparten los tres DC utilizados en la búsqueda. Las proteínas identificadas corresponden a 3 Ca²⁺-ATPasas del tipo vacuolar Tb927.8.1200..pep (I-VCa²⁺-ATPasa), Tb927.8.1160..pep (II-VCa²⁺-ATPasa), Tb927.8.1180..pep (III-VCa²⁺-ATPasa), y una translocador de Ca²⁺ tipo SERCA la Tb927.5.3400..pep. En base a estos resultados, dichas secuencias fueron seleccionadas como los posibles candidatos a identificar en el genoma de *T. evansi* en este estudio.

Las secuencias seleccionadas de *T. brucei* fueron alineadas mediante el programa Clustal W2. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 27, donde se confirma que las regiones de mayor homología, corresponden a los tres DC, empleados en la búsqueda. DC1: dominio citosólico entre las regiones transmembrana II y III (resaltado en amarillo), DC2: dominio o región de fosforilación (verde), DC3: el dominio de unión a ATP (azul claro), junto con un cuarto dominio DC4: dominio citoplasmático extremo C Terminal, resaltado en lila. A partir de estos cuatro DC se procedió a diseñar los oligos correspondientes (Tabla 4).

Los productos de amplificación de la PCR, empleando los pares de oligos DC, a las temperaturas óptimas determinadas, se muestran en la figura 28. Podemos observar que los productos de amplificación obtenidos a partir del ADN de *T. evansi*, empleando cada par de oligos DC, presentan un tamaño similar a los esperados para *T. brucei*. Sin embargo, debido a su similitud en tamaño, no se pueden diferenciar entre ellos por este método. Por lo tanto, se procedió a diseñar oligos específicos que nos permitieran amplificar las Ca²⁺ATPasas seleccionadas en *T. brucei* independientemente. Resultados similares, se obtuvieron para los productos de amplificados para *T. cruzi* y *Leishmania mexicana* cuando se usan los pares de oligos DC1-DC3, DC2-DC3 y DC2-DC4, pero con menor intensidad, así como otra serie de bandas de diferentes tamaños. Indicando con ello la posibilidad de que estos oligos puedan amplificar posibles Ca²⁺-ATPasa en diferentes tripanosomatidios gracias a la alta conservación evolutiva de estos dominios.

Tabla 10. Secuencias de dominios conservados para ATPasas de Ca²⁺ en *Trypanosoma brucei* seleccionadas por BLAST usando la base de datos GeneDB.

Sequences producing High-scoring	Score*	P(N)*	N*
AVPEGLP			
Tb927.8.1200..pep	37	1.00000	1
Tb927.10.11620..pep	37	1.00000	1
Tb927.8.1160..pep	37	1.00000	1
Tb927.8.1180..pep	37	1.00000	1
Tb927.1.2090..pep	23	1.00000	1
Tb927.4.1070..pep	29	1.00000	1
Tb927.5.3400..pep	36	1.00000	1
Tb09.v1.0760..pep	22	1.00	1
Tb11.01.5355..pep	26	1.00	1
CSDKTGTLT			
Tb927.10.12500..pep	49	0.97	1
Tb927.10.12510..pep	49	0.97	1
Tb927.5.3400..pep	49	0.98	1
Tb09.244.2570..pep	49	0.98	1
Tb927.8.1200..pep	49	0.98	1

Tb927.8.1160..pep	49	0.98	1
Tb927.8.1180..pep	49	0.99	1
Tb927.10.11620..pep	46	0.9998	1
Tb927.8.650..pep	43	1.00	1
Tb927.10.7170..pep	30	1.00	1
AVTGDGTND			
Tb927.8.1200..pep	48	0.995	1
Tb927.10.11620..pep	48	0.995	1
Tb927.8.1160..pep	48	0.995	1
Tb927.8.1180..pep	48	0.995	1
Tb927.5.5240..pep	38	1.00000	1
Tb09.v2.0400..pep	37	1.00000	1
Tb927.10.12500..pep	40	1.00000	1
Tb927.10.12510..pep	40	1.00000	1
Tb927.1.550..pep	29	1.00000	1
Tb927.5.3400..pep	40	1.00000	1

* Parámetros estadísticos de significancia de los resultados. Una vez terminada la extensión de todas las palabras, cada uno de los alineamientos realizados es evaluado para determinar su significación estadística. Para ello, el programa elimina los alineamientos inconsistentes (alineamientos que junten la misma parte de la secuencia problema con distintas partes de una secuencia en la base de datos). Los alineamientos resultantes son llamados pares de alta puntuación (*High Score Pairs* o HSPs, por sus siglas en inglés). P(N) indica la probabilidad de que la secuencia buscada (DC) esté presente en la secuencia y (N) el número de veces que la secuencia buscada fue encontrado dentro de la secuencia.

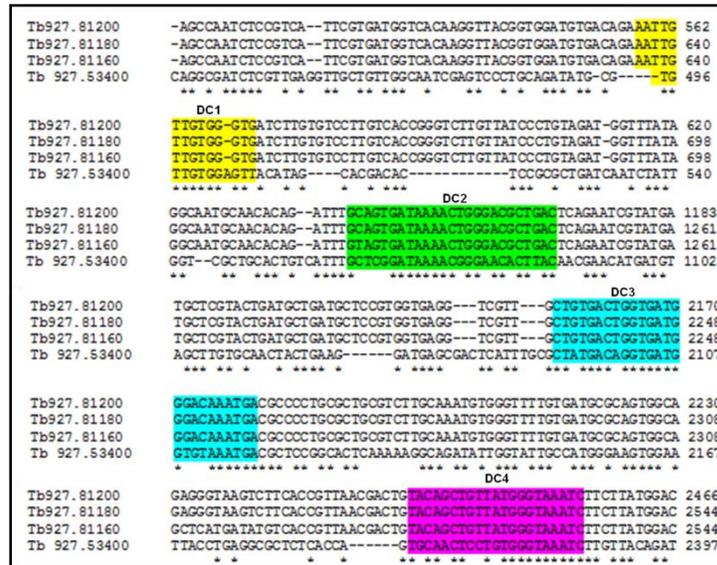


Figura 27. Alineamiento de Secuencias de posibles Ca²⁺-ATPasa en *Trypanosoma brucei*. Alineamiento realizado con el programa ClustalW2 de EBI. En la secuencia se resaltan dominios conservados. Dominio DC1 (Amarillo), Primer dominio de unión a Ca²⁺ (Gris claro), Dominio DC2 (Verde) Dominio DC3 conservado (Azul clara), Dominio DC4 (Lila). Las secuencias de *Trypanosomas brucei* utilizadas en este alineamiento fueron obtenidas de la base de Datos GeneDB bajo los números de acceso: Tb927.5.3400 descrita como Translocadora de Ca²⁺ (# NCBI AAZ11451.1 gi: 70801544), Tb927.8.1160 Descrita como Ca²⁺-ATPasa vacuolar (# NCBI 00728.1 gi: 70802983), Tb927.8.1180 Descrita como Ca²⁺-ATPasa vacuolar (# NCBI NC007281.1 gi: 72393718) y Tb927.8.1200 descrita como Ca²⁺-ATPasa vacuolar (# NCBI XM 841864.1 gi: 72392312). Los símbolos (*): 100% de homología, (:): Algunas de las secuencia presenta una sustitución conservativa). (:): Alguna de las secuencia presenta una secuencia semi conservativa.

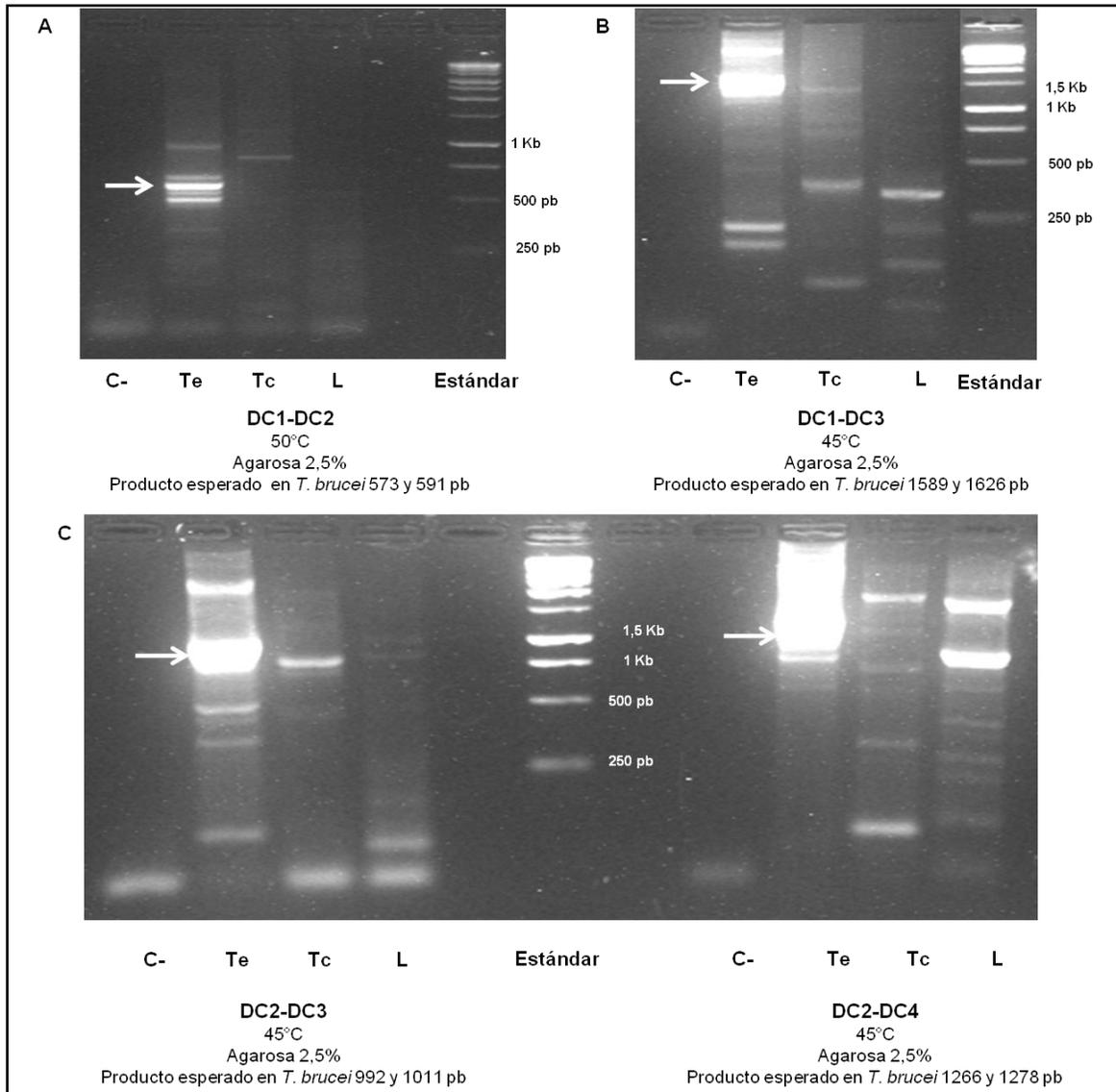


Figura 28. Amplificación por PCR de dominios conservados de posibles Ca^{2+} -ATPasas de *Trypanosoma evansi*. **A.** Amplificación del set de oligos DC1-DC2 a 50°C. **B.** Amplificación del set de oligos DC1-DC3 a 45°C. **C.** Amplificación de los sets DC2-DC3 y DC2-DC4 a 45°C. Los Carriles de cada gel son: Control negativo (C-). *Trypanosoma evansi* (Te), *Trypanosoma cruzi* (Tc) *Leishmania mexicana* (L). Los 3 gels presentados corresponde a gels de agarosa al 2.5%. Las flechas indican los productos obtenidos en *T. evansi*.

4.2.2.2. Caracterización molecular de las posibles Ca^{2+} -ATPasas vacuolares seleccionadas

4.2.2.2.1. Obtención de las secuencias nucleotídica de las posibles Ca^{2+} -ATPasa vacuolares (V Ca^{2+} -ATPasa)

Partiendo de las posibles V Ca^{2+} -ATPasa encontradas por el análisis de BLAST y CLUSTER, decidimos estudiar las dos primeras secuencias arrojadas, Tb 927.811200 correspondiente a la PMCA descrita por Luo y col., 2004 y Tb927.81160 descrita por Berriman, y col., 2005.

Amplificación por PCR y secuenciación de la I-V Ca^{2+} -ATPasa

Como estrategia para encontrar una secuencia similar a la I-V Ca^{2+} -ATPasa (posible Ca^{2+} -ATPasas vacuolar Gene DB # Tb 927.81200, #NCBI XM 841864.1 y gi: 72392313) de *T. brucei* en *T. evansi*, diseñamos sobre ésta una serie de oligos secuencia específica (SE) la cual usamos junto con los oligos DC para amplificar dicho gen. En la figura 29 A, se muestra los pares de oligos utilizados, los tamaños de los productos esperados y la región amplificada para cada par de oligos y en la parte B y C de la misma figura, se muestran los análisis por electroforesis en geles de agarosa de los productos obtenidos por PCR. Adicionalmente, se puede observar que los productos de amplificación obtenidos a partir del ADN de *T. evansi*, corresponden en tamaño (pares de bases) a los esperados en *T. brucei*. Cada uno de estos productos fue purificado a partir del gel y enviado a secuenciar.

A partir de las secuencias obtenidos de los productos de PCR, se realizo su análisis con el programa **BioLing** (Alinment and multiple contig editor 2000-2005), para obtener la secuencia nucleotídica consenso completa, la cual se muestra en la figura 30.

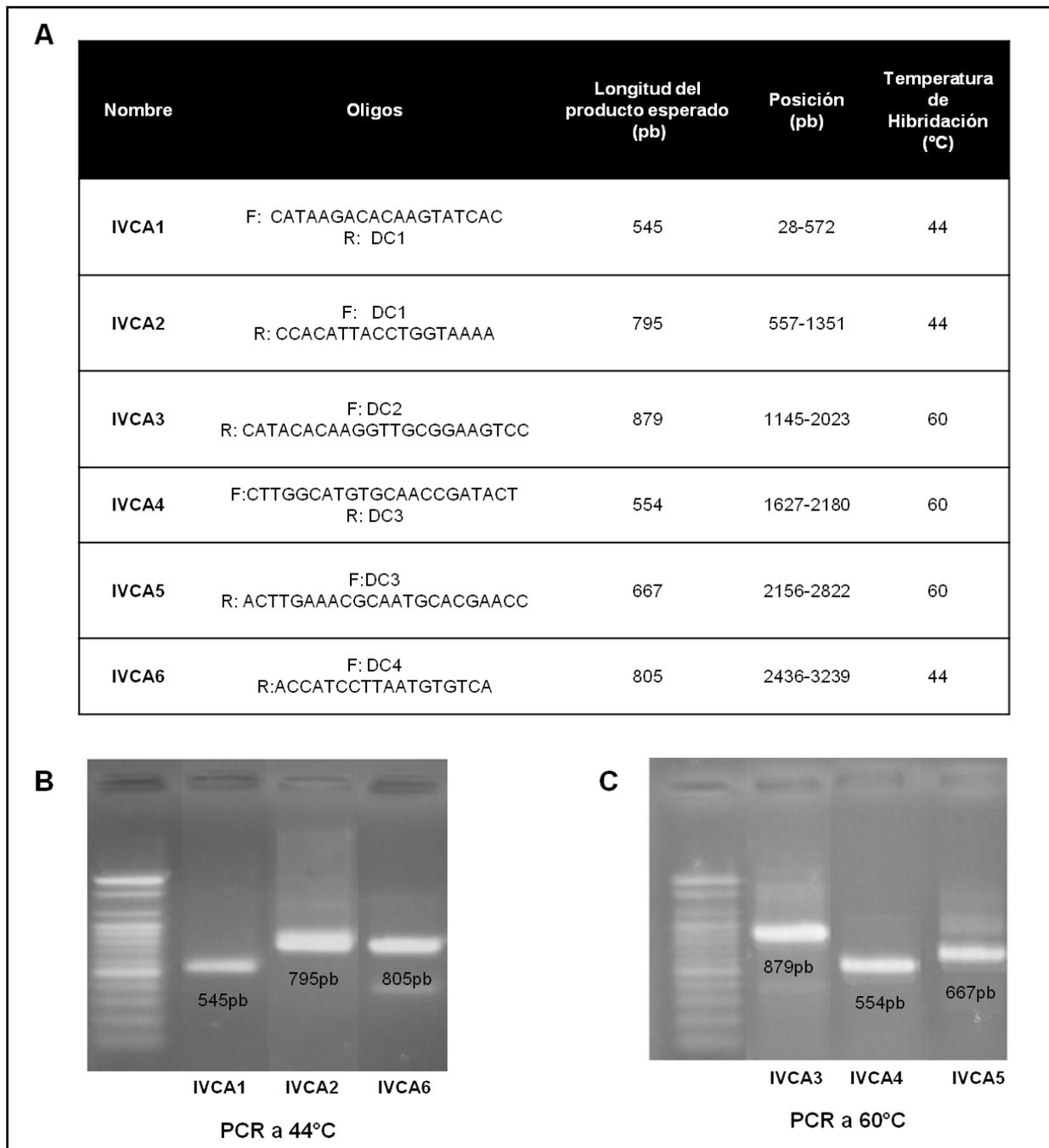


Figura 29. Productos de PCR de posible I-VCa²⁺-ATPasa de *Trypanosoma evansi*. A. Tabla que muestra los pares de oligos utilizados, los tamaños de productos esperados en *T. brucei*, la posición amplificada y la temperatura de elongación utilizada. Parte inferior de la figura muestra geles de agarosa al 2%. Ambos geles muestran los productos de amplificación en *T. evansi* utilizando los oligos (SE) diseñados en Ca²⁺-ATPasa tipo vacuolar y DC en *T. brucei*. B. Producto de PCR de pares de oligos PMCA 1,2 y 6 amplificados a 44°C C. Producto de PCR de pares de oligos PMCA 3,4 y 5 amplificados a 60°C.

ATGCATCCACTTGAGTCACCGCAGGAACATAAGACACAAGTATCACCAGAGAACAATGGCAATGAAACAAAA
 GCGTCTGCAAAAAGTTATTTACTTGCAATGAAGATCCAAAGCCCCTATACGAGGAACCTGGCGGCGTTGAGG
 GTATTGCCGAACGACTTGGCAGGAGTATAACAGATGGCATCGACTCTTTTTCTGTAGAGAATCGGCGTGCTGT
 GTATGGGAGGAATGAGCTTCTGAGGAGGCTCCGCTGACATTCTGGAAGATTTTTAAAGCTGCATGGAGTGA
 CCGCATGATCATACTTTGACCCTTGCCGCATGTGTGTCGCTTATCCTCGGGTAACTGTGCCGGAACCCGG
 ACACGAGAAGTTGACTATAAGACAGGTTGGATAGAGGGCACCGCCATTTATGGCCGTGATTGCAGTAAC
 CTCAGCATCGTCTATTCAGGATTACCGCAAGGAGTTGAAATCCGCTGCTCTTGTGGAGGAGAAGCTGTCTCAG
 CCAATCTCCGTCATTCGTGATGGTCAACAGGTTACGGTGGATGTGACAGAAATGTTGTGGGTGATCTTGTGT
 CCTGTGACCCGGTCTTGTATCCCTGTAGATGGTTTATACGTACGTGGTTTGTGAGTGTGTTGTTGATGAGTC
 GAGTGTGACTGGCGAGAATGATCTGAAAAAGAAAGGCGCCGAACATCCAATCTTACTTTCTGGGACTGTTGT
 GAGTACGGCTGAGGATGCTTACATTCTTGCCTGCGCCGTCGGTGAGTCTTCTTTTGGTGGAAAGCTGCTAAT
 GGAATCTCGTACGCGTGAACCGAGGGCGACTCCCTTGCAGGAGCGGTTGGATGAGCTGGCCGCTTTTA
 TTGGTGCAGTTGCAATTATATCCGCCGTTCTGCTTTTATAGTACTTTGTATCATCGAAATTGAGCGAATTGCT
 ACAAAACAAACAACAATTTTACC CGAAGAAGTTCCCTGAACTTTCTCTACTTTGTGTGACGATTGTTGTCGTCGC
 AGTGCCAGAGGGCTTCCGCTTGGCGGTGACGATTGCTCTTGCCTACTCACAGAACCAGATGCAGAAGGACA
 ATAATCAGGTGAGGCGTTTGTGTCTTGTGAGACAATGGGCAATGCAACACAGATTGACAGTGATAAACTGG
 GACGCTGACTCAGAATCGTATGACTGTGGTACAAGGTTACATTGGGATGCGGCGGTTCCGCTGTCTCGAATCC
 CGGAGATCCCTCGTCCACGGTAACTCTGGAGGGTGTGTCTAGTGATGCACAGTCGTTACTAATGCTTGGTCTT
 GCACTGAATAGTTCCGAGTGAGAAGGAGCTTTTACCAGTAATGTGGGAGCTGAGTCTGACTTACTGTCTCGAT
 GGACTGTGAATGACAACATCCGCAAGTTCCTGACGTAACGATGATTGGATTTTGTGGATCGCTTGTGAT
 CGGTACCGGTTAGTTGTAATGACAAGGAGCTTCCACACCAGAAGTTACGCATGACAAACCGCAGCCGTGGCT
 TTGCCATCTTTCTTTTACGAGCGAACCGGAAGTTTATGACTGCTGTGGTTGCAGGTGCGGATGGAGTTGTGAT
 GCAGTACGTGAAAGGGGGCTCTGATCGTGTGCTTGGCATGTGCAACCGATACTTGTGCTCAGAGGGTCTGT
 AGGAGCCGCTGACGGAGGAGGTAAGTATGATGACTGCGCAGATACGGTCAATAGCGGGGGACGCAAT
 CGCACAAATCGGCGTGGCATACGGGCGTATCGGTACGGACGGTGCCTTCCCGAGGAGGAACCCGAGGGAC
 CATTGTGTGGCTTGCATATTAGGCATCCAGGACCCGCTTCTGTCAGAGGTTGTGGATGCTGTGCGAATGT
 GCCAGCGTGCGGGAGTGACAGTGAGGATGTGTACGGGTGACAATCTCGACACAGCCGTTGCAATTTCTCGG
 CAATGTGGAATTTACAATCGACTGCGTGGTGTGATCTTGCCTCACTGGGAAGGACTTCCGCAACCTTGTGTATG
 ACACTTATGGTGACGAGGCGAACATGGAGAAGTTCTGGCCTGTTCTTGACCGGATGATGGTGTGATGGGGCTT
 CGCAGCCTCTGGACAAGCAACTGCTCGTACTGATGCTGATGCTCCGTTGGTGGAGTGTGCTGACTGGTG
 ATGGGACAAATGACGCCCTCGCTGCGTCTTGCATGTTGGGTTTTGTGATGCGCAGTGGCAGGATATAG
 CGGTGAAGTCCGGTGTATTTGTGCTTTTAGACGACAACCTCCGTTCTGTCCAGCGTGCCGTTGTTGGGGAC
 GGACTGTGAATGACAACATCCGCAAGTTCCTGACGCTGCAATTAACCGTGAACGTTGTTCTTTTCTATTAAC
 GTTGTAGGTACCCTCGTGGAGGGTAAGTCTTACCGTTAACGACTGTACAGCTGTTATGGGTAAATCTTC
 TTATGGACACACTTGGGCCCTCGCTCTCGCAACGGAGCAACCGACAGAGGATTGCTTAAATCGTGGTCCGT
 CTTCCCCCGAGCTCCCTTGTCTCACGTGCAATGTGGTTCAAAATTTTTCCGTTGCCACAGTTCAGCTAAC
 TGCTTTCTTTCTGTGCTCACGTTTGGTGGAAAGTATTTTGGGGAGGATGAGAATGGCAAGCATTGACCCGA
 ACATTTCTATTTCAACGTTTTTTGTTTTCGGCACTATTTGCCATGTTAAATTGTCGCAAAATGTACGGAGA
 AATGTGTTTGAAGGGATGGGTCCGTCGGTATTTTTATTGTTGTCGTCGGTTCGTCATTGCGTTTCAAGTGT
 GGCCATCTGCACCTTTAACGACTTTATGGGTGTCCTGCCCCCTTTCGATCAAGCAATGGGGTGAAGTATCGGT
 ATTGCTGCCATTTCACTTGTGTTGGGTATTTGAGCCGAGTGGTGAGCATCAGGGAACCTGTGTTTGCAGTGA
 TACCAGATAGTAAATGTCGACGGTAGCCTCTCGCCTCATCAAAGATGTTTCGGTGGCTGCGGAGCAGA
 GGCAGCGGGAGACGGACGGGACAAGTACGCCTCTTCTGCTTCTTGCGGTCCGTTGCGTGCAGTCCGG
 GTGGCGTAGACTTCAGGCAGAGCATGTGAAGAAACCTCGTGTGTTAATGCATTCCGCCGCGCATGGACGGA
 TCGCGATATGAAACGGGGCTCACCCGACAACCTTATGACACATTAAGGATGGTATGA

Figura 30. Secuencia nucleotídica de la posible I-VCa²⁺-ATPasa en *Trypanosoma evansi*. Secuencia consenso para posible PMCA de *T. evansi* obtenida a partir de los productos secuenciados. El ensamblaje de la secuencia se realizó en el programa **BioLing** (Alinment and multiple contig editor 2000-2005)

La traducción de esta secuencia a aminoácidos se realizó con el programa **BioLing** y posteriormente se introdujo en el programa “**Compute PI/Mw**” (Gasteiger, y col., 2005), empleando el servidor **ExpASY Proteomics**, el cual permitió predecir una proteína contentiva de 1080 residuos aminoacídicos, con un peso molecular aparente de 118.9 KDa y un punto isoeléctrico de 6.47 (Fig. 31).

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MHPLESPQEH	KTQVSPENNG	NETKSVLQKL	FTCNEDPKPL	YEELGGVEGI	AERLGTSTID
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
GIDFSFVENR	RAVYGRNELP	EEAPLTFWKI	FKAAWSDRMI	ILLTLAACVS	LILGLTVPEP
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
GHEKVDYKTG	WIEGTAILMA	VIAVTSASSI	QDYRKELKFR	ALVEENSAQP	ISVIRDGHKV
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
TVDVTEIVVG	DLVSLSPGLV	IPVDGLYVRG	LSVVVDESSV	TGENDLKKKG	AEHPILLSGT
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
VVSTAEDAYI	LACAVGESSF	GGKLLMESRL	DGEPRATPLQ	ERLDELAAFI	GRVAIISAVL
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
LFIVLCIIEI	ERIATNKQQF	YPKKFLNFL	LCVTIVVAV	PEGLPLAVTI	ALAYSQNMQ
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
KDNNQVRRLC	ACETMGNATQ	ICSDKTGTLT	QNRMTVVQGY	IGMRRFRVSN	PGDPSSTVNL
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
EGVSSDAQSL	LMLGLALNSS	SEKELLPGNV	GAESDLLSRW	TWRTDKGNKT	DQAILDFVDR
<u>490</u>	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>520</u>	<u>530</u>	<u>540</u>
VLISVPGSCN	DKELPHQKLR	MTNRSRGFAI	FPFTSERKFM	TAVVAGADGV	VMQYVKGGSD
<u>550</u>	<u>560</u>	<u>570</u>	<u>580</u>	<u>590</u>	<u>600</u>
RVLGMCNRYL	SSEGREEPLT	EEVTEMITAQ	IRSIAGDANR	TIGVAYGRIG	TDGAVPEEEP
<u>610</u>	<u>620</u>	<u>630</u>	<u>640</u>	<u>650</u>	<u>660</u>
EGPFVWLALL	GIQDPLRPEV	VDAVRMCQRA	GVTVRMCTGD	NLDTAVAIRS	QCGIYNRLRG
<u>670</u>	<u>680</u>	<u>690</u>	<u>700</u>	<u>710</u>	<u>720</u>
DLALTGKDFR	NLVYDYGDE	ANMEKFWPVL	DRMMVMGRSQ	PLDKQLLVLM	LMLRGEVVAV
<u>730</u>	<u>740</u>	<u>750</u>	<u>760</u>	<u>770</u>	<u>780</u>
TGDGTNDAPA	LRLANVGFVM	RSGTDIAVKS	GDIVLLDDNF	RSVQRAVWVG	RTVNDNIRKF
<u>790</u>	<u>800</u>	<u>810</u>	<u>820</u>	<u>830</u>	<u>840</u>
LQLQLTVNVV	SFLLTVVGTL	VREGKSSPLT	TVQLLWVNL	MDTLAALALA	TEQPTEDCLN
<u>850</u>	<u>860</u>	<u>870</u>	<u>880</u>	<u>890</u>	<u>900</u>
RGPSSPRAPL	VSRRMWFTIF	SVATVQLTAF	FSVLTFGGKY	FGEDENGKHL	HRTFLFNVFV
<u>910</u>	<u>920</u>	<u>930</u>	<u>940</u>	<u>950</u>	<u>960</u>
FGTIFHMLNC	RKLYRELVNF	EGMGRSVFFI	VVVGSCIAFQ	VLAICTFNDF	MGVRPLSIKQ
<u>970</u>	<u>980</u>	<u>990</u>	<u>1000</u>	<u>1010</u>	<u>1020</u>
WGVSIGIAAI	SLVVGILSRV	VSIREPVFAL	IPDSRNVDGS	ASRLIKDVSV	AAEQRQRETD
<u>1030</u>	<u>1040</u>	<u>1050</u>	<u>1060</u>	<u>1070</u>	<u>1080</u>
GTSDASSLLA	GRLRAQSRWR	RLQAEHVKKP	RVVNAFRRAW	TDRDMKRGST	RQLYDTLRMV

Figura 31.- Secuencia aminoácídica de la posible I-VCa²⁺-ATPasa en *Trypanosoma evansi*. La traducción se realizó con ayuda del programa Compute PI/Mw" (Gasteiger E. y col., 2005)

Caracterización de los dominios funcionales presentes en la I-VCa²⁺-ATPasa de Trypanosoma evansi

Con el propósito de evaluar la presencia de los dominios funcionales característicos de las ATPasa tipo P, en la secuencia aminoácidos obtenida para la I-VCa²⁺-ATPasa de *T. evansi*, procedimos a realizar su análisis con el programa **InterProScan**. Los resultados se muestran en la figura 32, donde cabe destacar que la I-V-Ca²⁺-ATPasa presenta: un dominio conservado E1-E2 ubicado entre los aminoácidos 137 y 374 predicho por la base de datos PFAM (morado). Un dominio citosólico A (entre los aa 154 y 265) predicho tanto por la base de datos SUPERFAMILY como por GENE 3D. Un dominio de fosforilación P (entre los aa 384 y 390) predicho por la base de datos PROSITE. Un dominio de unión de nucleótido N (entre los aa 372 y 615) predicho por GENE 3D. Estos dominios A P y N son característicos de las ATPasa tipo P.

Adicionalmente, nuestra secuencia presenta 6 dominios que la identifican como transportadora de cationes (los cuales se encuentran entre los aa 216-230 382-396 608-619 630-640 721-740 y 744-756) predicha por la base de datos PRINT, dominio que es corroborado por la base de datos TIGRFAMs (entre los aa 137-404 y 689-801) y un dominio de Hidrolasa (entre los aa 381-734) predicho por la base de datos PFAM. Así como 10 posibles dominios transmembrana, sobre la base de datos TMHMM, característico de las ATP-asas tipo P.

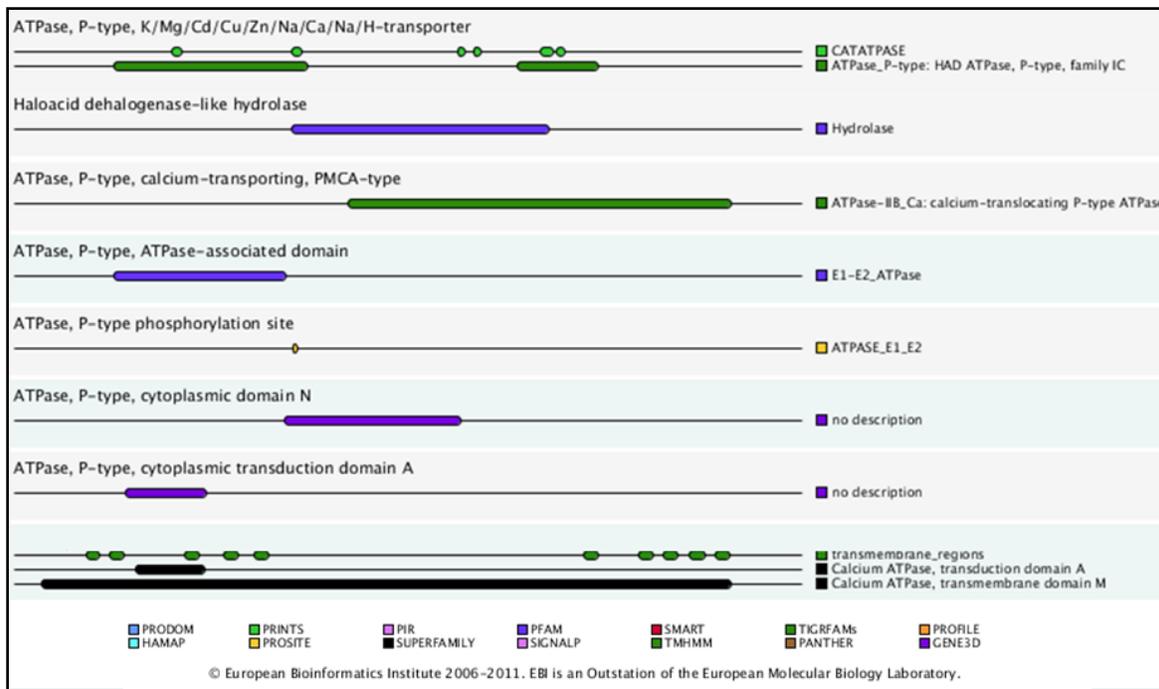


Figura 32. Dominios funcionales presentes en la posible I-VCa²⁺-ATPasa en *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios funcionales encontrados en la secuencia I-V-Ca²⁺-ATPasa de *T. evansi*. Este esquema fue arrojado por el programa InterproScan. Los colores mostrados en el esquema corresponden a las bases de datos donde fue encontrado dicho dominio.

Identificación de posibles dominios transmembrana presentes en la Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA de *Trypanosoma evansi*

Una búsqueda más detallada de regiones altamente hidrofóbicas se realizó con ayuda de los programas **TopPred** (0.01 Topology prediction of membrane proteins www.mobyle.pasteur.fr). La figura 33 muestra la escala de hidrofobicidad para la secuencia obtenida en *T. evansi* realizada por el programa TopPred, este análisis nos permitió seleccionar 10 posibles dominios transmembrana (TM), con una alta confiabilidad marcados como M1 - M10. Estas regiones presentan un valor de hidrofobicidad cercano o mayor a 1. Para verificar la posición de los dominios TM seleccionados, se empleó el programa **HMMTOP** (2.0 Prediction of transmembrane helices and topology of protein www.Enzim.hu), el cual corrobora nuestra selección. La posición de los dominios TM sobre la secuencia obtenida para la I-VCa²⁺-ATPasa, arrojadas por cada programa se muestra en la tabla 11.

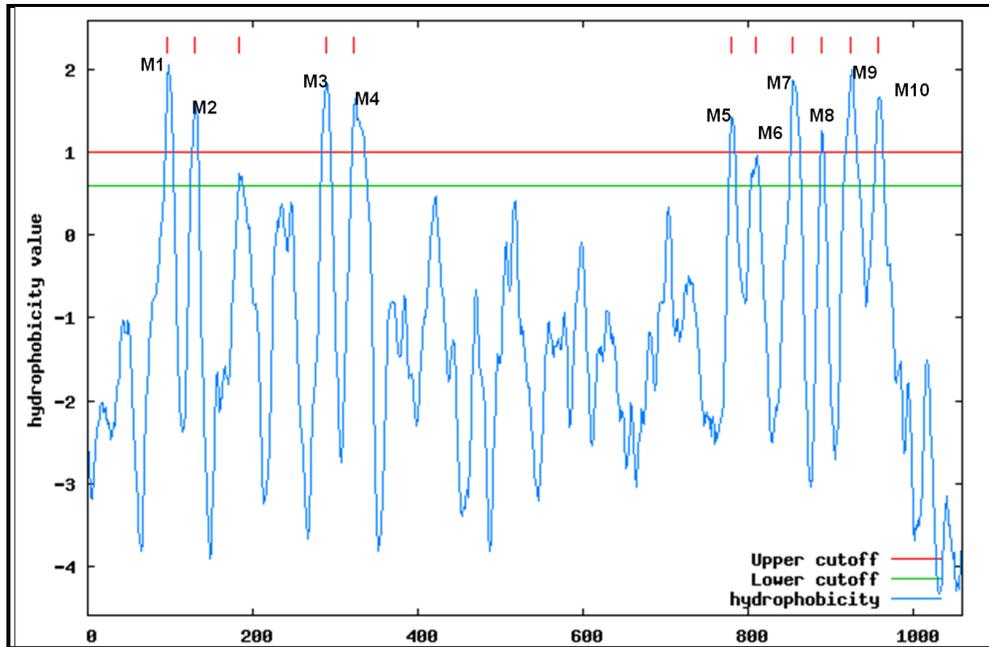


Figura 33. Posibles dominios transmembrana presentes en la Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA de *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios transmembrana encontrados en la secuencia I- VCa^{2+} -ATPasa de *T. evansi*. Este esquema fue arrojado por el programa TopPred. Valores superiores a 1 (línea roja) sugieren dominios transmembrana altamente confiables. Valores entre 0.6 y 1 (línea verde) sugieren posibles dominios transmembrana.

Tabla 11. Posibles dominios transmembrana de posible Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA de *Trypanosoma evansi*

Dominios Transmembrana PMCA4b	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (InterProScan)	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (TopPred)	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (HMMTOP)
M1	99-117	98-118	99-116
M2	131-151	131-151	131-150
M3	235-255	184-204*	286-308
M4	288-308	290-310	327-349
M5	329-349	324-344	780-802
M6	781-801	781-801	809-831
M7	856-876	811-831*	855-874
M8	890-910	855-875	893-910
M9	925-947	890-910	927-946
M10	965-981	926-946	961-983
M11		960-980	

*Secuencias predichas con un bajo nivel de confiabilidad del programa utilizado

Análisis de la presencia de dominios de unión a CaM en la posible Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA de Trypanosoma evansi

Para poder evidenciar si la I-VCa²⁺-ATPasa se trata de una posible PMCA, procedimos a buscar dominios de unión a CaM, los cuales son característicos de esta enzima. Aun cuando, la búsqueda de dominios funcionales no arrojó un dominio clásico de unión a CaM, procedimos a analizar esta secuencia con el programa “**Calmodulin target Database**”, el cual permite definir posibles dominios no convencionales de unión a CaM. Este programa utiliza como criterios: la hidrofobicidad de la secuencia, su tendencia a generar estructuras α-helice, la carga de los residuos aminoacídicos presente y el tamaño de los mismos para predecir dominios de unión a CaM. Los resultados del análisis se muestran en la figura 34, donde un puntaje de 0 a 9, donde 9 indica la mayor posibilidad de que esa región o dominio sea capaz de enlazar CaM. En esta figura podemos observar 2 posibles regiones de unión a CaM con los mayores puntajes. La primera de 12 residuos, ubicada entre los aa 653 y 664 y la segunda hacia el extremo C-terminal, de 14 residuos, entre los aa 1028 y 1042, las cuales tienen una alta probabilidad de interactuar con la CaM.

..651	QC GIYNRLRG	DLALTGKDFR	NLVYDTYGDE	ANMEKFWPVL	DRMMVMGRSQ
.....	6678999999	9998764333	3321000000	0000000000	0000000000
..701	PLDKQLLVLM	LMLRGEVVAV	TGDGTNDAPA	LRLANVGFVM	RSGT DIAVKS
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
..751	GDIVLLDDNF	RSVQRAVVWG	RTVNDNIRKF	LQLQLTVNVV	SFLLTVVGTL
.....	0000000001	2333333333	3333333332	1000000000	0000000000
..801	VREGKSSPLT	TVQLLWVNULL	MDTLAALALA	TEQPTEDCLN	RGPSSPRAPL
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
..851	VSRRMWFTIF	SVATVQLTAF	FSLVTFGGKY	FGEDENGKHL	HRTFLNFVIV
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
..901	FGTIFHMLNC	RKLYRELVNF	EGMGRSVFFI	VVVGSCIAFQ	VLAICTFNDF
.....	0000000123	4666666666	6666666432	1000000000	0000000000
..951	MGVRPLSIKQ	WGVSIGIAAI	SLVVGILSRV	VSIREPVFAL	IPDSRNV DGS
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
..1001	ASRLIKDVSV	AAEQRQRETD	GTSDASSLLA	GRLRAQSRWR	RLQAEHVKKP
.....	0000000000	0000000000	0012346788	8888888888	8876432100
..1051		RVVNAFRRAW	TDRDMKRGST		RQLYDTLRMV
.....		0000000000	0000000000		0000000000
n					

Figura 34. Dominios no convencionales de unión a calmodulina presentes en la posible Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA de Trypanosoma evansi. La figura muestra el análisis de nuestra secuencia de posible PMCA en *T. evansi* programa “**Calmodulin target Database**”. El programa evalúa la secuencia asignando valores entre 0 y 9, donde 9 representa un posible dominio de unión a CaM.

Análisis de similitud y homología de la posible Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA de Trypanosoma evansi

Una vez obtenida la secuencia para la I-VCa²⁺-ATPasa de *T. evansi* procedimos a realizar un BLAST utilizamos la base de datos de la NCBI. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12, la cual lista las 10 proteínas con mayor puntaje de similitud. Se observa que la secuencia obtenida se asemeja a una serie de VCa²⁺-ATPasa descritas en diferentes tripanosomatideos, resaltando las proteínas con mayor similitud encontradas en *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania major*. Los resultados obtenidos arrojan el mayor puntaje 1835, correspondiente al 100 % de cobertura, con una Ca²⁺-ATPasa tipo vacuolar descrita en *T. brucei* (número de acceso NCBI XP 846957.1), lo que indica la mayor similitud de la secuencia obtenida en *T. evansi* con la secuencia originalmente utilizada para el diseño de los oligos (Tb927.81200). Así como un puntaje de 1210 (98% cobertura) y 1134 (97% cobertura) para *T. cruzi* y *Leishmania major*. Estos resultados nos permiten corroborar el alto grado de similitud existente entre las proteínas de *T. evansi* y *T. brucei*.

Tabla 12. Secuencias homologas a la posible Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA de

Trypanosoma evansi

Numero De acceso en NCBI	Descripción	Puntaje máximo	% Query
XP_846957.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase 2 <i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	1835	100%
AAL55434.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase <i>Trypanosoma brucei</i>	1781	100%
XP_846955.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase 1 <i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	1736	97%
CBH13124.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase, putative <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> DAL972	1731	100%
AAP46286.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase <i>Trypanosoma brucei</i>	1711	97%
AAL55433.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase <i>Trypanosoma brucei</i>	1711	97%
XP_846953.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase <i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	1607	97%
XP_817343.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase <i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener	1210	98%
XP_821271.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase <i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener	1209	98%
XP_001680970.1	vacuolar-type Ca ²⁺ -ATPase <i>Leishmania major</i> strain Friedlin	1134	97%

Posteriormente, procedimos a alinear las secuencias de las I-VCa²⁺-ATPasa seleccionadas (distinguidas en rojo) *T. brucei* (GI: 72392312), *T. cruzi* (GI: 71657662) *Leishmania* (GI: 157864520), para establecer los porcentajes de homología entre sí. También se incluyó en este análisis a la PMCA4B *Homo sapiens* (GI: 48255957), por ser

la isoforma mas caracterizada de la familia de las PMCA. La tabla 13, muestran los porcentajes de homología entre las secuencias alineadas. Cabe destacar que la secuencia obtenida para la I-VCa²⁺-ATPasa comparte un 99% de homología con la secuencia reportada en *T. brucei*, mientras que solo comparte 34% de homología con la PMCA de humanos demostrándose así una marcada diferencia estructural entre estas.

Tabla 13. Porcentaje de homología entre secuencias alineadas con la posible Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA de *Trypanosoma evansi* (ClustalW2 EBI Bioinformatics)

SeqA	Nombre	Long	SeqB	Nombre	Long	% homología (Score)
1	PMCA4B	1205	2	<i>T. brucei</i>	1080	35.0
1	PMCA4B	1205	3	<i>T. cruzi</i>	1103	35.0
1	PMCA4B	1205	4	<i>Leishmania</i>	1104	36.0
1	PMCA4B	1205	5	<i>T. evansi</i>	1080	34.0
2	<i>T. brucei</i>	1080	3	<i>T. cruzi</i>	1103	61.0
2	<i>T. brucei</i>	1080	4	<i>Leishmania</i>	1104	58.0
2	<i>T. brucei</i>	1080	5	<i>T. evansi</i>	1080	99.0
3	<i>T. cruzi</i>	1103	4	<i>Leishmania</i>	1104	62.0
3	<i>T. cruzi</i>	1103	5	<i>T. evansi</i>	1080	61.0
4	<i>Leishmania</i>	1104	5	<i>T. evansi</i>	1080	58.0

La figura 35 muestra el alineamiento obtenido correspondiente a la tabla 13, en ella se destacan sobre las secuencia los DC característicos de los miembro de la familia de Ca²⁺-ATPasas del tipo PMCA. Sobre la PMCA de *Homo sapiens* se destaca los dominios TM (gris), el dominio de unión a CaM (verde) y los epitopes que permiten que esta proteína sea reconocida por los anticuerpos comerciales 5F10 y JA3 (rojo).

```

T.evansi      -----MHPLESPQEHKTVQVSPENNGNET----KSVLQKLF 32
T.brucei     -----MHPLESPQEHKTVQVSPENNGNET----KSVLQKLF 32
T.cruzi      MRRSSNSFSYGSCEDEMEETKMRRSRLMESVRRRTSIRLNFTDGDVGVSIRTDLENIFA 60
Leishmania   --MAPLNATDIVVSTESPQHRMAGAAAVPHAPGTF*TERAIGGEI----QMPLEDIFA 54
PMCA4B      -----MTNPSDRVLPA NSMAESREGDFGCTV-----MELRKLME 34
                                         *          *...:

T.evansi     CN--EDPKPLYEELGGVEGIAERLGT SITDGIDS--FSVENRRAVYGRNELPEEAPLTFW 88
T.brucei     CN--EDPKPLYEELGGVEGIAERLGT SITDGIDS--FSVENRRAVYGRNELPEEAPLTFW 88
T.cruzi      RA--NEGMPLYENLGRVEGIAAKLQMDLSNGVRS--DTVERRRTVFG RNELPEEEELSF 116
Leishmania   RA--NEAVPMYKLGKVEGIANLHTSLKSGVDG--NTVEARRVFFGKNALPEEPLTFW 110
PMCA4B      LRSRDALTQINVHYGGVQNLCSRLKTSPEVGLSGNPADLEKRRQVFGHNVIPPKPKPFL 94
          :   :   . * * : . . * . . * : .   : * * * . : * * : * :

T.evansi     KIFKAAWSDRMIILLTLAACVSLILGLTVPE-----PGHEKVDYKTGWIEGTA 136
T.brucei     KILKAAWSDRMIILLTLAACVSLILGLTVPE-----PGHEKVDYKTGWIEGTA 136
T.cruzi      RIYKAAWSQDMILLLSGA AFVSLVGLTVPE-----PGRDKADTGTGWIEGFA 164
Leishmania   EMYKASWEDRMIRLLAVAAIVSLILGLTVPD-----PGETE VNYTTGWIEGFA 158
PMCA4B      ELVWEALQDVTLIILEIAAIIISLVLSFYRPAGEENELCGQVATTPEDENEAQA GWIEGAA 154
          .:   :   . * : : * * * : * * * : *
                                         . . . : : * * * * *

M1

T.evansi     ILMAVIAVTSASSIQDYRKELKFRALVE-ENSAQPISVIRDGHKVTVDVTEIVVGDVLSL 195
T.brucei     ILMAVIAVTSASSIQDYRKELKFRALVE-ENSAQPISVIRDGHKVTVDVTEIVVGDVLSL 195

```


T.brucei	LYDTLRMV-----	1080
T.cruzi	IYCRLASTMQ-----	1103
Leishmania	VYRQMVELTSNP-----	1104
PMCA4B	RTPLLDDEEEENFDKASKFGTRVLLLDGEVTPYANTNNNAVDCNQVQLPQSDSSLQSLLET	1203
	:	
	----- JA3	
T.evansi	--	
T.brucei	--	
T.cruzi	--	
Leishmania	--	
PMCA4B	SV 1205	

Figura 35.- Alineamiento de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA de *Trypanosoma evansi* con PMCA reportadas en otros tripanosomatidios y PMCA de humanos. Alineamiento realizado con el programa ClustalW2 de EBI. En la secuencia se resaltan dominios transmembrana reportados para PMCA4b así como los predichos por TopPred para *T. evansi* (gris claro), Primer dominio de unión a Ca^{2+} (Amarillo), dominio de fosforilación donde se destaca en rojo el residuo de Ac. Aspártico (verde claro), Dominio de unión a ATP (Azul claro), Dominio citosólico conservado (Azul oscuro), Dominio de unión a anticuerpos 5F10 y JA3 (Rojo) y Dominio de unión a CaM (Verde oscuro). Las secuencias utilizadas en el alineamiento corresponden: *T. evansi* (secuencia problema). *T. brucei* (GeneDB # 927.81200 NCBI # XP 846957.1 gi: 72392313). *Leishmania major* (# NCBI XP 001680970.1 gi: 157864520). *T. cruzi* (# NCBI XP 817343.1) y PMCA4B *Homo sapiens* (# NCBI NP001675.3 gi: 48255957).

Igualmente, se destacan sobre la I-VCa²⁺-ATPasa de *T. evansi* los posibles dominios TM (gris claro) de alta confiabilidad predichos por los programas **TopPred y HMMTOP**, así como los posibles dominios de unión a CaM (verde) predichos por el programa “**Calmodulin target Database**”. En la figura 35 se observa que todos los dominios DC y transmembrana se encuentran en la misma posición en la secuencia, y cabe destacar, que el segundo posible dominio de unión a CaM de la IV-Ca²⁺-ATPasa de *T. evansi*, se encuentra en la misma posición de la región N-terminal que el descrito para la PMCA de *Homo sapiens*. Este alineamiento nos permitió sugerir el modelo mostrado presentado en la figura 36.

Modelo Topológico de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA de *Trypanosoma evansi*

El modelo propuesto (Fig.36), presenta más del 80% de la proteína expuesta hacia la cara citosólica del parasito similar a lo que ocurre con sus homologas descritas en eucariotas superiores (Verma y col., 1988, Shull y Greb, 1988). Por otra parte, se puede observar la presencia de tres regiones citoplasmáticas siendo la de mayor tamaño la que se encuentra entre los dominio M4 y M5 y en el cual están presentes los dominios de Fosforilación (P) y de unión a ATP (N). También puede observarse en esta región, la presencia de un dominio putativo de unión a CaM. Una diferencia significativa de nuestro modelo con respecto a los predichos para PMCA de eucariotas superiores, es que la posible PMCA de *T. evansi* no posee un extremo C-Terminal tan largo. Sin embargo esta

región posee un dominio putativo de unión a CaM la cual alinea con la PMCA 4b de humanos (Fig. 35).

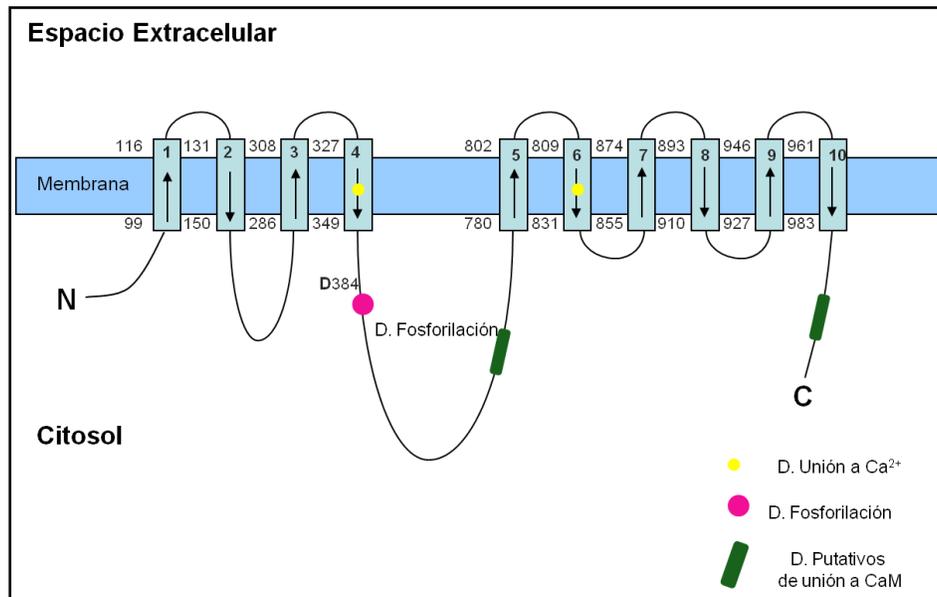


Figura 36. Modelo topológico de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios Transmembrana encontrados en la secuencia de I- VCa^{2+} -ATPasa de *T. evansi* predicha por los programas Tpopred y HMMTOP y el dominio putativo de unión a CaM predicho por el programa “*Calmodulin target Database*”. Las flechas indican la orientación de los dominios transmembrana.

Posteriormente, procedimos a modelar tridimensionalmente la secuencia obtenida usando para ello, el servidor Phyre 2. El modelo tridimensional predicho cubrió un 96% de la secuencia obtenida, con una confiabilidad superior al 90% (fig. 37 A). Seis (6) templados fueron seleccionados por el servidor como moldes, basando en un análisis heurístico que garantiza la máxima confianza, identidad y el mayor porcentaje de cobertura de la alineación, para la predicción de la estructura tridimensional. Los números de PDB de los templados usados fueron: C1mhSA (protón ATPasa en Neurospora), c3b9bA (Ca^{2+} -ATPasa SERCA E_2 + Fluoruro de Berilio), C3ixZA (H^+/K^+ ATPasa gástrica de cochino + Fluoruro de aluminio), C2zxeA (Estructura cristalizada de bomba de $\text{Na E}_2+\text{Pi}$), C3b8eC (Estructura cristalizada bomba protón de membrana plasmática) y C3b8eC (Estructura cristalizada bomba Na/K).

En la figura 37, se muestra el modelo tridimensional obtenido para la secuencia de la I- VCa^{2+} -ATPasa. En esta estructura sugerida, se observan similitudes con respecto a la estructura tridimensional y distribución de los dominios P, N y A, así como de las regiones

transmembrana descritas en la ATPasa usadas como molde por el programa Phyre. Sin embargo, es importante mencionar que hasta la fecha ninguna PMCA ha sido cristalizada. Por lo tanto, el servidor utilizado solo puede establecer sus predicciones en base a los modelos de proteínas relacionadas que han sido cristalizadas, tales como la bomba de Ca^{2+} de retículo endoplasmático y las bombas Na^+/K^+ , las cuales fueron mencionadas anteriormente.

Una vez obtenidas las evidencias moleculares que nos permiten sugerir a I- VCa^{2+} -ATPasa como posible PMCA en *T. evansi*, procedimos a caracterizar de la misma manera a II- VCa^{2+} -ATPasa en *T. evansi*.

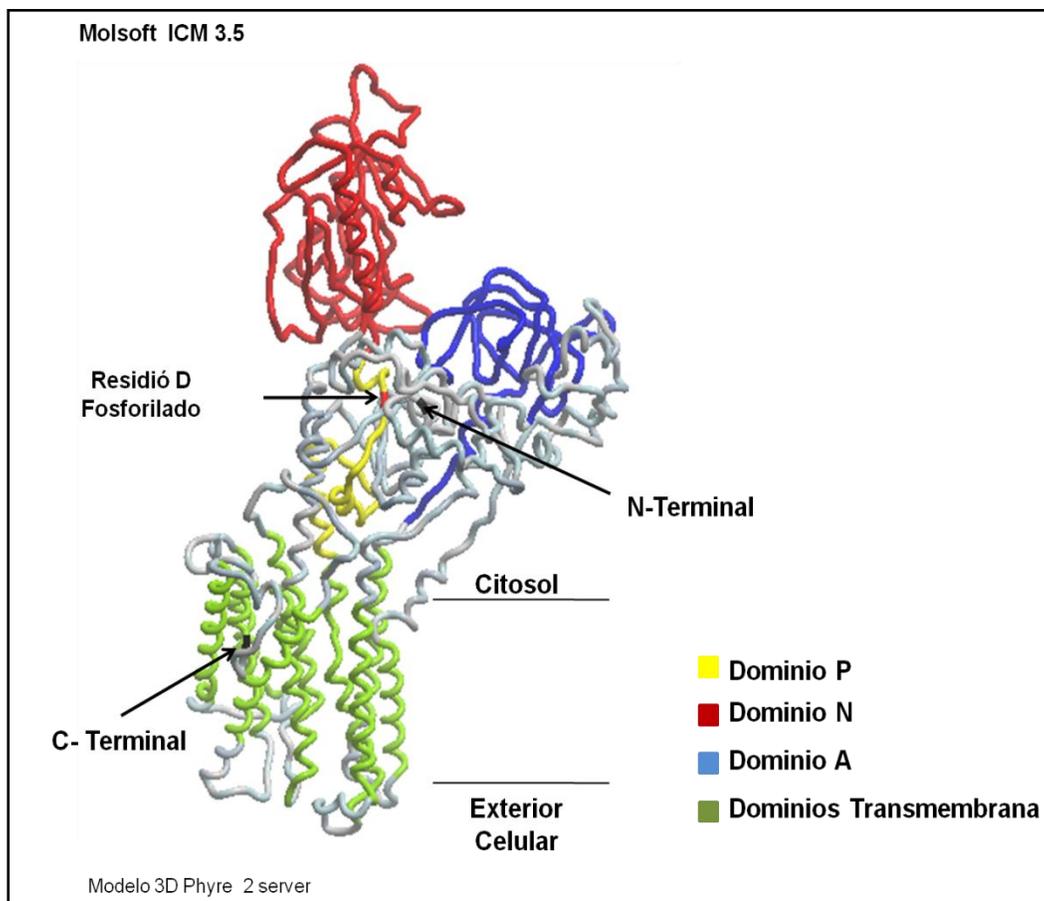


Figura 37. Modelo tridimensional de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA de *Trypanosoma evansi*. Modelos 3D de posible PMCA de *T. evansi* obtenida a través del servidor Phyre y visualizado en el programa Molsoft. En la figura se destacan posibles dominios P (Residuo D en rojo), N (rojo) y A (azul) así como las regiones transmembrana (verde).

4.2.2.2.2. Caracterización molecular de la II- VCa^{2+} -ATPasas de *Trypanosoma evansi*

Amplificación por PCR y secuenciación de la II-VCa²⁺-ATPasa de Trypanosoma evansi

Para la amplificación de II-VCa²⁺-ATPasa en *T. evansi*, se realizó el mismo procedimiento utilizado para I-VCa²⁺-ATPasa. En la figura 38 A, se muestran una tabla que contiene los oligos DC y SE utilizados, los tamaños de los productos de amplificación esperados y la región amplificada para cada par de oligos. Mientras que en la figura 38B, se muestra el análisis por electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR obtenidos para cada par de oligos. Nótese, que las bandas obtenidas presentan el mismo número de pares de bases esperados. Los productos obtenidos fueron purificados a partir del gel y mandados a secuenciar.

Un análisis realizado de los productos de PCR, mediante el programa **BioLing** (Alinment and multiple contig editor 2000-2005), permitió obtener la secuencia nucleotídica consenso para la II-V-Ca²⁺-ATPASA de *T. evansi*, la cual se muestra en la figura 39. La traducción de esta secuencia a aminoácidos se realizó mediante el programa **BioLing**, la cual se muestra en la figura 40. El análisis de dicha secuencia mediante el programa "Compute PI/Mw" (Gasteiger E. y col., 2005), empleando el servidor **ExpASY Proteomics**, nos permitió predecir una proteína contentiva de 1090 residuos aminoacídicos, con un peso molecular aparente de 119.5 KDa y un punto isoeléctrico de 5.77.

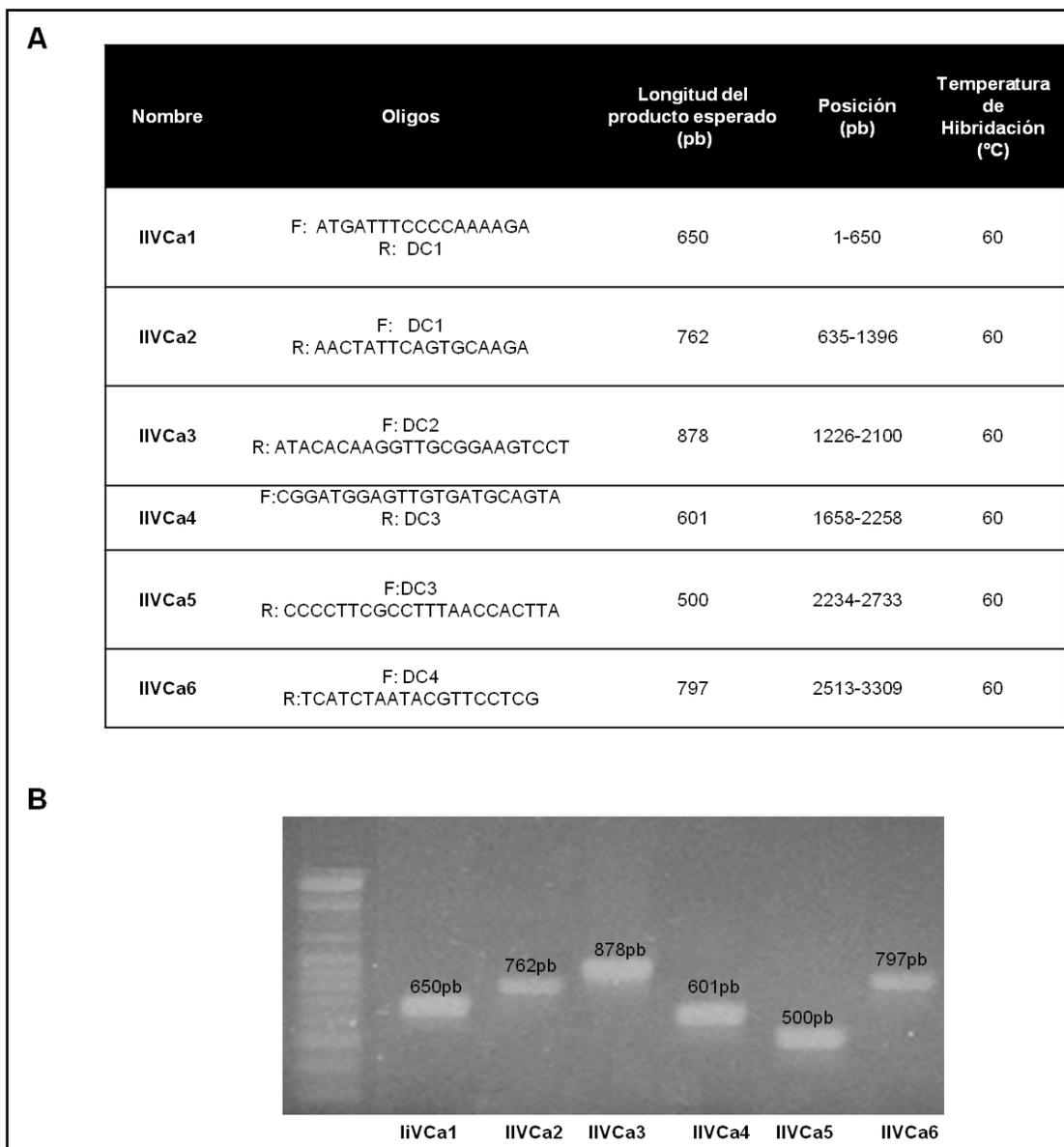


Figura 38. Productos de PCR de la posible II-VCa²⁺-ATPasa de *Trypanosoma evansi* **A.** Tabla que muestra los pares de oligos utilizados, los tamaños de productos esperados en *T. brucei*, la posición amplificada y la temperatura de elongación utilizada. **B.** Producto de amplificación en *T. evansi* utilizando los oligos (SE) diseñados en Ca²⁺-ATPasa vacuolar y DC en *T. brucei*. Los productos fueron amplificados a 60°C visualizado en un gel de agarosa al 2%.

ATGATTTCCCAAAAAGACACTTCGAACTACGGTACACTTGCCGGCCGCGGTGAGAGAGGCAAGCGTTTTTATC
 CACTGGCCTTACCAGAAGTGATGGGTCCGTTGCAGTGGAGGTGGAGCTCGAAGATCGTATCGGCATAGGGATTA
 AGGGAGAGCTTACACCTTGTTCAGTTGCGTCCGGTACGCTAAGCCCTATACGAGGAAGTGGCGCGTTGAG
 GGTATTGCCGAACGACTTGGCACGAGTATAACAGATGGCATCGACTCTTTTTCTGTAGAGAATCGCGTGTGTG
 TATGGGAGGAATGAGCTTCTGAGGAGGCTCCGCTGACATTTTGGAAAGATTTTAAAAGTGCATGGAGTGACCGG
 ATGATCATCTTTTGGCCCTTGGCCGATGTGTGTCGCTTATCCTCGGGTAACTGTGCCGGAACCCGGACACGA
 GAAGGTTGACTATAAGACAGGTTGGATAGAGGGCACCGCCATTCTTATGGCCGTGATTGCAGTAACCTCAGCAT
 CGTCTATTACAGGATCCCGCAAGGAGTTGAAATCCGTGCTCTTGTGGAGGAGAACTCTGCTCAGCCAATCTCAG
 CCATTCGTGATGGTCACAAGGTTACGGTGGATGTGACAGAAATTGTTGTGGGTGATCTTGTGCTTGTACCAGG
 GTCTTGTATCCCTGTAGATGGTTTATACGTACGTGGTTTGTGAGTGTGTTGTTGATGAGTCGAGTGTGACTGGCG
 AGAATGATCTGAAAAAGAAAGGCGCCGAACATCCAATCTACTTTCTGGGACTGTTGTGAGTACGGCTGAGGATG
 CTTACATTCTTGGTGCGCCGTCCGGTGTGCTTCTTTTGGTGGAAAGCTGCTAATGGAATCTCGTCTCAGCGGTG
 AACCGAGGGCGACTCCCTTGCAAGGAGCGATTGGACGAATTAGCTGGGTTTATTGGTCCGATAGGAATTGGAGCG
 GCAGTGATACTTATGTCTCTGCTTTCTTTGTTTTACATCCTTCTCGTTCTTCTGTTGTAAGAAGAGTTACGCGCAA
 AAAAGTTTCTTGATATTTTTTACTTTGTGTGACGATTGTTGTCGTGCGAGTGCCAGAGGGCTTGGCCTTGGCGGT
 GACGATTGCTTTCGCTACTCACAGAGCCAGATGCAGAAGGACAATAATCAGGTGAGGCGTTTGTGTGCTTGTG
 AGACAATGGGCAATGCAACACAGATTTGTAGTGATAAAACTGGGACGCTGACTCAGAATCGTATGACTGTGGTAC
 AAGGTTACATTGGGATGCGGCGGTTCCGTGTCTCGAATCCCGGAGATCCCGTCCACGTTAATCTGGAGGGTG
 TGTCTAGTGATGCACAGTCGTTACTAATGCTTGGTCTTGCAGTGAATAGTTCGAGTGAGAAGGAGCTTTTACCAG
 GTAATGTGGGAGCTGAGTCTGACTTACTGTCTCGATGGACGTGGCGTACCGACAAGGGCAACAAAAGTACCAA
 GCGATATTGGATTTTGTGGATCGCGTGTGATATCGGTACCGGGTAGTTGTAATGACAAGGAGCTTCCACACCAG
 AAGTTACGCATGACAAACCGCAGCCGTGGCTTTGCCATCTTCTTTTACGAGCGAACCGGAAGTTTATGACTGCT
 GTGGTTGCAGGTGCGGATGGAGTTGTGATGCAGTACGTGAAAGGGGGCTCTGATCGTGTGCTTGGCATGTGCA
 ACCGATACTTTCGTGAGAGGGTGTGAGGAGCCGTGACGGAGGAGGTAAGTATGATGACTGACTGCGCAGAT
 ACGGTAATAGCGGGGACGCAAAATCGACAATCGCGTGGCATACGGGCGTATCGGTACGGACCGTGCAGTT
 CCCGAGGAGGAACCCGAGGGACCATTGTGTGGCTTGCAGTATTAGGCATCCAGGACCCGCTTCTGCCAGAGG
 TTGTGGATGCTGTGCAATGTGCCAGCGTGCAGGAGTGCAGTGGAGTGTGACGGGTGACAATCTCGACAC
 AGCCGTTGCAATTTCTCGGCAATGTGGAATTTACAATCGACTGCGTGGTGTATCTTGCCTCACTGGGAAGGACTT
 CCGCAACCTTGTGTATGACACTTATGGTGACGAGGCGAACATGGAGAAGTTCTGGCCTGTTCTTGACCGGATGA
 TGGTGATGGGGCGTTCGACGCTCTGGACAAGCAACTGCTCGTACTGATGCTGATGCTCCGTGGTGGAGTGGT
 GCTGTGACTGGTGTGGGACAAATGACGCCCCGCGTGCCTGCGTCTTGAATGTGGGTTTTGTGATGCGCAGTGGC
 ACGGATATAGCGGTGAAGTCCGGTGTATTTGTGCTTTAGACGACAACCTCCGTTCTGTCCAGCGTGCAGTTGT
 TGGGACGGACTGTGAATGACAACATCCGCAAGTTCCCTGCAGTTACAACCTTTCTATTAATATTGCTTCTATTGTTG
 TTGTTTTTGTGGTTCTTTTTGTCTGCTCATGATATGTCACCGTTAACGACTGTACAGCTGTTATGGGTAATCTT
 CTTATGGACACACTTGGCGCCCTCGCTCTCGCAACGGAGCAACCGACAGAGGATTGCTTAAATCGTGGTCCGTC
 TTCCCCCGAGCTCCCCTTGTCTCACGTCGAATGTGGTTGACAATACTGACTGCTACTGTAGTTCAGGTTGTTAG
 CGTCTTTTATTAACCAATATGGTGGTAAAGTGGTTAAAGGCGAAGGGGAAGGAACTTCCAAGTGTGTTTTAAC
 GTTTTTATTTCTTTACCATATTAATATGTTTAAATGCCCGCAAAGTGTATGATGAAGTTAATGATTTGAAGGGCTT
 TTTATTCGTTCAAAGTCATTTTTGGTTATCGTGGTTTGTGTGTTGTTTTCAGGTTTTGGCCGTGGAGGTCTTAA
 AAGAGTTCATGTCGTGTGACCGTTGAGAGCAGAACAGTGGATTGCATCGATTCTGATTGCATCGCTGACACTTG
 TATTTGTTCTGTTTCCGCCTGATTCCGGTGTCCGAACCTTCAATTTGAAAAGGGTCTGAAGTGGAGACATGG
 AGCCGGGGCGCTCGCATTGCCGTGAAGTTAGCTGAGGACGTTGAGCATCATTCTTCTGCTTCAATAATGTG
 GGAAGTTATATGCGTTTTGGACAGCGCTGGTGGCGAGGGCACAATGGCAGAGGGTGGAGAACATGTAACAAAT
 GCGGGGCGTTAGCCAGTTTTGGTGGTGCAGGCATAGTCATCCTCGGGAGCGAGGAAT

Figura 39. Secuencia nucleotídica de la posible II-VCa²⁺ATPasa de *Trypanosoma evansi*. Secuencia consenso para posible VCa de *T. evansi* obtenida a partir de los productos secuenciados. El ensamblaje de la secuencia se realizó en el programa **BioLing** (Alignment and multiple contig editor 2000-2005)

10	20	30	40	50	60
MISPKDTSNY	GTLAGRGRER	QAFNSTGLTR	SDGSVAVEVE	LEDRIGIGIK	GELHTLFSCV
70	80	90	100	110	120
GDAKPLYEEL	GGVEGIAERL	GTSITDGIDS	FSVENRRAVY	GRNELPEEAP	LTFWKIFKTA
130	140	150	160	170	180
WSDRMIILLP	LAACVSLILG	LTVPEPGHEK	VDYKTGWIEG	TAILMAVIAV	TSASSIQDSR

190	200	210	220	230	240
KELKFRALVĒ	ENSAQPISAĪ	RDGHKVTVDV̄	TEIVVGDVSV̄	LSPGLVIPVD	GLYVRGLSVV̄
250	260	270	280	290	300
VDESSVTGEN̄	DLKKKGAEHP̄	ILLSGTVVST̄	AEDAYILACĀ	VGESSFGGKL̄	LMESRLDGEP̄
310	320	330	340	350	360
RATPLQERLD̄	ELAGFIGRIḠ	IGAAVILMSL̄	LSLFYILLVL̄	RGKEELRAKĀ	FLDIFLLCVT̄
370	380	390	400	410	420
IVVVAVPEGL̄	PLAVTIALAȲ	SQSQMOKDNN̄	QVRRLCACET̄	MGNATQICSD̄	KTGTTLTQNRM̄
430	440	450	460	470	480
TVVQGYIGMR̄	RFRVSNPGDP̄	SSTVNLEGVS̄	SDAQSLMLLḠ	LALNSSSEKĒ	LLPGNVGAES̄
490	500	510	520	530	540
DLLSRWTWRT̄	DKGNKTDQAĪ	LDFVDRVLIS̄	VPGSCNDKEL̄	PHQKLRMTNR̄	SRGFAIFPFT̄
550	560	570	580	590	600
SERKFMTAVV̄	AGADGVVMQȲ	VKGGSDRVLḠ	MCNRYLSSEḠ	REEPLTEEVT̄	EMITAQIRSĪ
610	620	630	640	650	660
AGDANRTIGV̄	AYGRIGTDGĀ	VPEEEPEGPF̄	VWLALLGIQD̄	PLRPEVVDAV̄	RMCQRAGVTV̄
670	680	690	700	710	720
RMCTGDNLDĀ	AVAISRQCGĪ	YNRLRGDLĀL̄	TGKDFRNLVȲ	DTYGDEANMĒ	KFWPVLDMM̄
730	740	750	760	770	780
VMGRSQPLDK̄	QLLVLMMLR̄	GEVVAVTGDḠ	TNDAPALRLĀ	NVGFVMRSGT̄	DIAVKSGDIV̄
790	800	810	820	830	840
LLDDNFRSVQ̄	RAVVWGRTVN̄	DNIRKFLQLQ̄	LSINIASIVV̄	VFVGSFLSAH̄	DMSPLTTVQL̄
850	860	870	880	890	900
LWVNLLMDTĪ	AALALATEQP̄	TEDCLNRGPS̄	SPRAPLVSRĀ	MWLTILTATV̄	VQVVSLLLLT̄
910	920	930	940	950	960
QYGGKWLKAK̄	GKELPTVVFN̄	VFIFFTIFNM̄	FNARKVYDEV̄	NVFEGLFIRS̄	KSFLVIVVCC̄
970	980	990	1000	1010	1020
VGfQVLAVEV̄	LKEFMSCVPL̄	RAEQWIASIL̄	IASLTLVFVS̄	VSRLIPVSEP̄	SFEKGAELED̄
1030	1040	1050	1060	1070	1080
MEPGARRIAV̄	KLAEDVEHHS̄	SASNNVGSYM̄	RFGQRLVARĀ	QWQRVREHVT̄	MRGVSQFWWS̄
1090					
RHSHPRERGĪ					

Figura 40.- Secuencia aminoácídica de la posible II-VCa²⁺ ATPasa de *Trypanosoma evansi* Secuencia aminoácídica de posible PMCA en *T. evansi*. Programa Compute PI/Mw” (Gasteiger E. y col., 2005)

Caracterización de los dominios funcionales presentes en la II-V-Ca²⁺-ATPa de *Trypanosoma evansi*

Con el propósito de evaluar la presencia de posible dominios funcionales sobre la II-V-Ca²⁺-ATPasa, utilizamos nuevamente el programa **Inter ProScan**. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 41, donde cabe destacar la presencia de los mismos dominios identificados en I-V-Ca²⁺-ATPasa, un dominio conservado E1-E2, entre los aminoácidos 163 y 400, los dominios citosólicos: A, entre los aa 180 y 291, P (dominio de fosforilación), entre los aa 410 y 416 y N (dominio de unión de nucleótido), entre los aa 398 y 641.

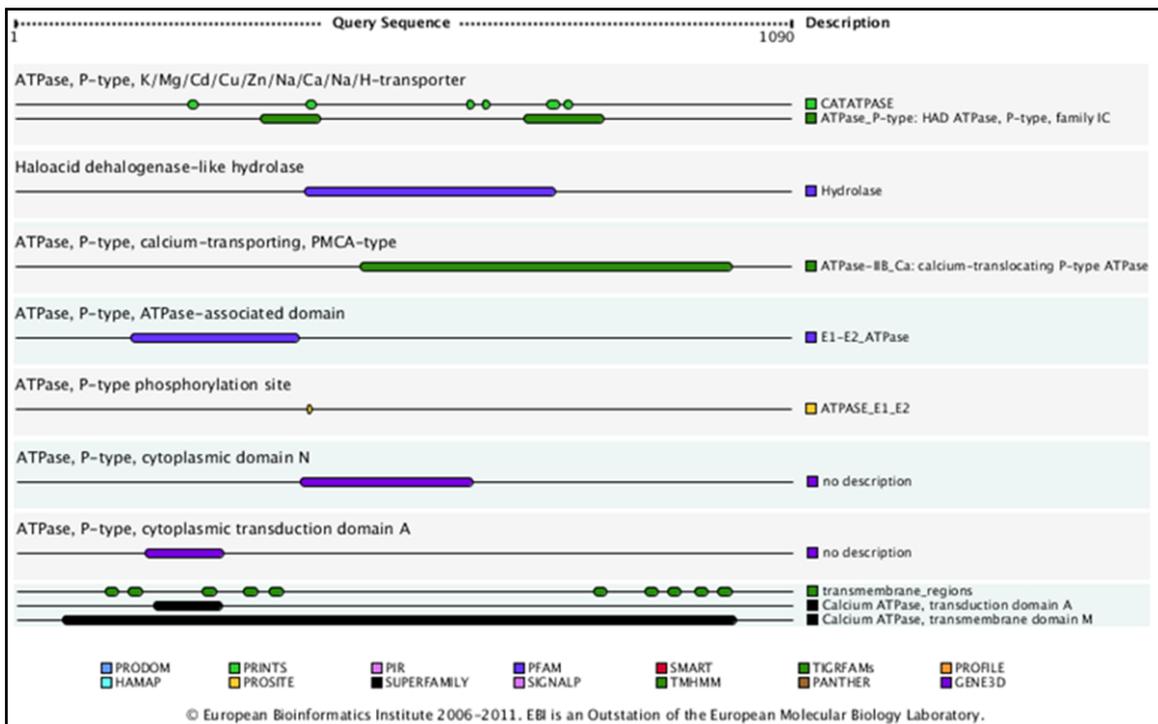


Figura 41. Dominios Funcionales presentes en la posible II-V-Ca²⁺-ATPasa *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios conservados encontrados en la secuencia de II-V-Ca²⁺-ATPasa de *T. evansi*. Este esquema fue arrojado por el programa InterproScan. Los colores mostrados en el esquema corresponden a las bases de datos donde fue encontrado dicho dominio.

Identificación de posibles dominios transmembrana presentes en la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo vacuolar de *Trypanosoma evansi*

Posteriormente, procedimos a buscar sobre la secuencia obtenida para la II- VCa^{2+} -ATPasa, los posibles dominios TM con la ayuda de los programas **TopPred**, y **HMMTOP** para corroborar los dominios predichos por **Inter ProScan**. En la figura 42, se observan los posibles dominios TM predichos por TopPred, identificados como M1 – M10, cuyos valores de hidrofobicidad son más cercanos a 1 (línea roja en la figura) y en la tabla 14, se muestra la correspondiente ubicación de estos dominios en la secuencia de la II- VCa^{2+} -ATPasa de *T. evansi*. Cabe destacar, que los patrones obtenidos para los dominios TM de la II- VCa^{2+} -ATPasa y la I- VCa^{2+} -ATPasa, son muy similares.

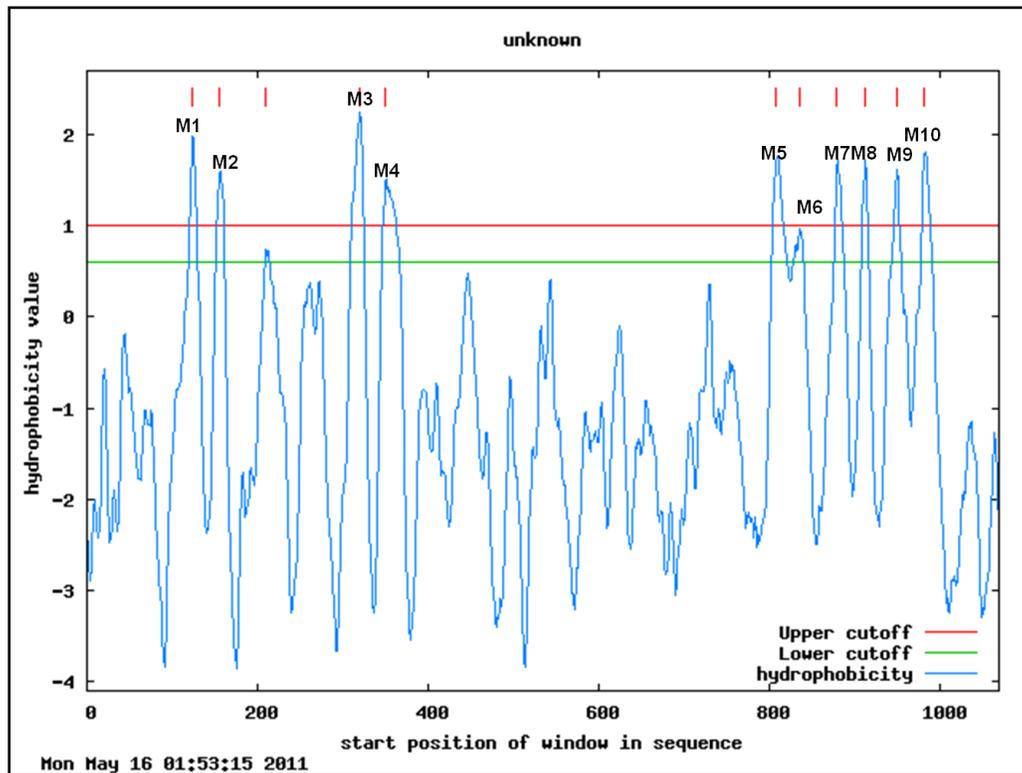


Figura 42. Posibles dominios transmembrana presentes en la posible de Ca^{2+} -ATPasa tipo vacuolar de *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios Transmembrana encontrados en la secuencia de PMCA de *T. evansi*. Este esquema fue arrojado por el programa TopPred. Valores superiores a 1 (línea roja) sugieren dominios transmembrana altamente confiables. Valores entre 0.6 y 1 (línea verde) sugieren posibles dominios transmembrana.

Tabla 14. Posibles dominios transmembrana de posible Ca²⁺-ATPasa tipo vacuolar de *Trypanosoma evansi*

Dominios Transmembrana PMCA4b	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (InterProScan)	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (TopPred)	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (HMMTOP)
M1	125-143	124-144	126-143
M2	157-177	157-177	158-175
M3	261-281	320-340	
M4	319-339	351-371	323-340
M5	354-374	810-830	
M6	811-829	837-857	812-829
M7	882-900	881-901	882-899
M8	914-932	913-933	914-931
M9	953-971	951-971	952-970
M10	985-1005	984-1004	985-1002

Análisis de la presencia de dominios de unión a CaM en la posible Ca²⁺-ATPasa vacuolar de *Trypanosoma evansi*

Igualmente, para evidenciar si la secuencia obtenida para la II-VCa²⁺-ATPasa presenta dominios putativos de unión a CaM, procedimos a su análisis con el programa “*Calmodulin target Database*”. Dicho resultado se muestra en la figura 43, donde se observa que la secuencia posee dos posible dominios de unión a CaM, el primero de 9 residuos, ubicados entre los aa 682 y 691, con un puntaje de 7 y el segundo de 12 residuos, ubicados entre los aa 899 y 910, con un puntaje de 8.

..651	RMCQRAGVTV	RMCTGDNLD	AVAIRQCGI	YNRLRGDLAL	TGKDFRNLVY
.....	000000000	000000001	1234444456	777777776	543222211
..701	DTYGDEANME	KFWPVLDRMM	VMGRSQPLDK	QLLVLMMLR	GEVAVTGDG
.....	000000000	000000000	000000000	000000000	000000000
..751	TNDAPALRLA	NVGFVMRSGT	DIAVKSGDIV	LLDDNFRSVQ	RAVWVRTVN
.....	0000011222	222222222	2222211000	0000011222	222222222
..801	DNIRKFLQLQ	LSINIASIV	VFVGSFLSAH	DMSPLTTVQL	LWVNLLMDTL
.....	2222211000	000000000	000000000	000000000	000000000
..851	AALALATEQP	TEDCLNRGSP	SPRAPLVSRR	MWLTILTATV	VQVSVLLLT
.....	000000000	000000000	000000000	000000000	1123456788
..901	QYGKWLKAK	GKELPTVFN	VFIFFIFNM	FNARKVYDEV	NVFEGLFIRS
.....	888888888	7654321100	000000000	000000000	000000000
..951	KSFLVIVVCC	VGQVLAVEV	LKEFMSCVPL	RAEQWIASIL	IASLTLVFVS
.....	000000000	000000000	000000000	000000000	000000000
..1001	VSRLIPVSEP	SFEKGAELD	MEPGARRIAV	KLAEDVEHHS	SASNNVGSYM
.....00					

Figura 43. Dominios no convencionales de unión a calmodulina presentes en la Ca²⁺-ATPasa tipo vacuolar de *Trypanosoma evansi*. La figura muestra el análisis de nuestra secuencia de posible PMCA en *T. evansi* programa “*Calmodulin target Database*”. El programa evalúa la secuencia asignando valores entre 0 y 9, donde 9 representa la mayor posible de dominio de unión a CaM.

Análisis de similitud y homología de la posible Ca²⁺-ATPasa vacuolar de Trypanosoma evansi

Posteriormente, procedimos a analizar nuestra secuencia mediante un BLAST, utilizando nuevamente la base de datos de la NCBI, la cual relaciono a IIVCa con una serie de proteínas Ca²⁺-ATPasa tipo vacuolar. El análisis mostrado en la tabla 15, arrojó un mayor puntaje (2207) de similitud de nuestra secuencia con una Ca²⁺-ATPasa tipo vacuolar descrita en *T. brucei* bajo el número de acceso NCBI XP 846953.1, la cual corresponde a la secuencia identificada en la base de datos GeneDB bajo el número Tb927.81160. Nótese, nuevamente que al igual como sucedió con el caso de la PMCA, esta secuencia fue la originalmente utilizada para el diseño de los oligos.

Tabla 15. Secuencias homologas a la posible Ca²⁺-ATPasa tipo vacuolar de *Trypanosoma evansi*

Numero De acceso en NCBI	Descripción	Puntaje máximo	% Query
XP_846953.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase [Trypanosoma brucei TREU927]	2207	99
CBH13124.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase, putative [Trypanosoma brucei gambiense DAL972]	2014	95
XP_846955.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase 1 [Trypanosoma brucei TREU927]	1785	98
AAP46286.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase [Trypanosoma brucei]	1752	98
XP_846957.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase 2 [Trypanosoma brucei TREU927]	1693	93
AAL55434.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase [Trypanosoma brucei]	1642	93
EFZ32137.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase, putative [Trypanosoma cruzi]	1385	95
XP_821271.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	1383	96
XP_817343.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase [Trypanosoma cruzi strain CL Brener]	1382	95
XP_001680970.1	vacuolar-type Ca2+-ATPase [Leishmania major strain Friedlin]	1243	95

Una vez determinada que nuestra secuencia comparte similitud con las bombas de Ca²⁺ tipo vacuolar descritas en varios Tripanosomatidios, procedimos a alinear dichas secuencias para establecer los porcentajes de homología entre sí. Las secuencias utilizadas en el alineamiento, marcadas en rojo, fueron tomadas de la tabla 15 y corresponde a *T. brucei* (GI: 72392305), *T. cruzi* (GI: 71659092) y *Leishmania major* (GI: 157864520), igualmente, se incluyo a la PMCA4B *Homo sapiens* (GI: 48255957). La tabla 16, muestran los porcentajes de homología entre las secuencias alineadas, cabe destacar que nuestra secuencia comparte nuevamente una alta homología con la secuencia

Leishmania APALRLANVGFVMRSG-TDIAVKSADIVLLDDNFRSVQRAVVWGRVCVNDNIRKFLQLQLT 806
 PMCA4B G**FALKKADVGFAMGIAGTDVAKEASDII**LDNFTSIVKAVMWGRNVYDSISKFLQFQLT 849
 .***: *:*:*.* .**:* :*:*** ***: * :*:*** * *.* ***:**:

5F10

T. evansi INIASIVVVVFGSFLSAHDMSPLTT**VQLLWVNL**MDTLAALALATEQPTEDCLNRGPSSP 872
T. brucei INIASIVVVVFGSFLSAHDMSPLTT**VQLLWVNL**MDTLAALALATEQPTEDCLNRGPSSP 872
T. cruzi VNVSSVVLTFGLSFLSSHTSPLST**VQLLWVNL**IMDTLAALALATEEPSEACLDRGPIPR 871
 Leishmania VNVYSVALTFIGSLMAGGHSSPLTT**VQLLWVNL**IMDTLAALALATEEPSEELKRQPIHR 866
 PMCA4B VNVVAVIVAF**TGACITQ**--DSPLK**VQMLWVNL**IMDTFASLALATEPPTESLLKRRPYGR 907
 :* : : . * * : : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

M5

D. Unión Ca²⁺

M6

D. no clásico de unión a CaM

T. evansi RAPLVSRM**WLTILTATVVQVSVLL****LTQYGGKWLKAK**-----GKELPTVFNVF 922
T. brucei RAPLVSRM**WLTILTATVVQVSVLL****LTQYGGKWLKAK**-----GKELPTVFNVF 922
T. cruzi KAPLVSRM**WCTIL**LAGYQTVSTLLVERFGGSWFDVS-----GGEMQITVFNVF 921
 Leishmania KAPLVSRM**MHTIT**LIAVYHLVLAALV**LQEF**GYRWFGLER-----YSREHSTIIFNVF 918
 PMCA4B NKPLISRT**MMKNI**LGHAFYQL**IVIF**ILVFAGEK**FFD**ISGRKAP**LHSPPSQHYT**IVFN**TF** 967
 . **:* * * . * : : : : * : : . : * : * : *

M7

M8

T. evansi IFFTI**FNMFN**ARKVYDEVNVF**EGLF**IRSK**SFLVIVCCVGFQVLA**VEVLKEF**MSCV**PLRA 982
T. brucei IFFTI**FNMFN**ARKVYDEVNVF**EGLF**IRSK**SFLVIVCCVGFQVLA**VEVLKEF**MSCV**PLRA 982
T. cruzi LLSV**IFHMF**NARKLYEEMNCF**EGLW**KRSR**IFVC**IVGF**CF**AFQ**V**FSV**EM**LGS**F**MQ**V**SLRG 981
 Leishmania VFGAL**FQMF**NCRKLYDEVDF**FEG**-FERSK**LFV**F**VM**CF**CV**V**FQ**IIAV**QAF**GG**FMD**V**CR**LR**F** 977
 PMCA4B **VL**MQ**L**NE**INS**RKI**HG**EKN**V**FS**G**-I**Y**RNI**I**F**C**S**V**L**G**T**F**I**C**Q**I**F**V**E**F**GG**K**P**F**S**C**T**S**L**S**L 1026
 : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

M9

T. evansi EQWIASILIASLTLV**FVSV**SRLIPVSEPSFEK**GAE**LEDMEPGARRIAVK**LAED**VEHHS-S 1041
T. brucei EQWIASILIASLTLV**FVSV**SRLIPVSEPSFEK**GAE**LEDMEPGARRIAVK**LAED**VEHHS-S 1041
T. cruzi EQWVGCLALSFLTLV**FVAV**ARLV**PE**ELPL**PE**-AEMDDMEPEARRMAMK**L**TADVEAHA-A 1039
 Leishmania SEWTATIMLTFATIP**GM**VSRLIPVEEA**HFER**ELDAENIDEDAR**Q**FLV**K**LAKDVERTADE 1037
 PMCA4B **SQ**WL**W**CL**F**IG**I**GE**L**L**W**Q**F**ISA**I**PT**R**SL**K**FL**KE**AG**H**GT**T**KE**E**IT**K**DA**E**GL**E**IDA**H**EM**E**L 1086
 .:* : : : : * : : . : : * : * : *

M10

T. evansi ASNNVGSYMR**FQ**RLVARAQ**W**Q**R**-VREH-VTMRGVS-----QFWWSRHSHPRERGI---- 1090
T. brucei ASNNVGSYMR**FQ**RLVARAQ**W**Q**R**-VREH-VTMRGVS-----QFWWSRHSHPRERGWRRMS 1094
T. cruzi REG-AGGHLLGRRL**LAQ**AM**W**Q**Q**-VREH**II**AVRSVN-----AFRRARIDRMHTS**V**AKDI 1092
 Leishmania RAGRS**GE**AL**NK**AKRARVLSLWYRAYAE**H**VGT**LR**VVN-----AFRR**AH**FDRDMTSEL**S**SRNV 1092
 PMCA4B RR**Q****L**W**ER**GL**N**RI**Q**T**Q**I**K**V**V**K**A**F**H**SS**L**H**S****E**S**I**Q**K**P**Y**N**Q**K**S**I**H**S**F**M**T**H**E**F**A**I**E**E**L**P**R**T**P** 1146
 . : : : : * : : . : : * : * : *

D. union a CaM

T. evansi ----- 1101
T. brucei AWCEERI----- 1101
T. cruzi YCRLASTM----- 1100
 Leishmania YRQMV**EL**TSPNP----- 1104
 PMCA4B LLDEEEEN**PD**KASK**F**G**T**R**V**LL**D**G**E**V**T**P**Y**AN**T**NN**A**V**D**C**N**Q**V**L**P**Q**S**D**S**S**L**Q**S**L**E**T**S**V 1205

Figura 44.- Alineamiento de Ca²⁺-ATPasa tipo vacuolar de *Trypanosoma evansi* con PMCA reportadas en otros tripanosomatidos y PMCA de humanos. Alineamiento realizado con el programa ClustalW2 de EBI. En la secuencia se resaltan Los dominios transmembrana de la PMCA 4B asi como los predichos por el programa TopPred para *T. evansi* (Gris claro). Primer dominio de unión a Ca²⁺ (Amarillo), dominio de unión a ATP donde se destaca en rojo el residuo de Ac. Aspártico (Verde claro), Segundo dominio unión a Ca²⁺ (Azul oscuro), Dominios de unión a CaM en PMCA asi como los dominios putativo de unión a CaM predichos en la secuencia de *T. evansi* por el servidor “**Calmodulin target Database**”. Las secuencias utilizadas en el alineamiento corresponden: *T. evansi* (secuencia problema). *T. brucei* (GeneDB # 927.81160 NCBI # XP 846953.1 GI: 72392305). *T. cruzi* (# NCBI XP 821271.1 GI: 71659092) y *Leishmania major* (# NCBI XP 001680970.1 GI: 157864520). y PMCA4B *Homo sapiens* (# NCBI NP001675.3 gi: 48255957). Los símbolos utilizados corresponden : (*) 100% de Homología entre los residuos. (:) Una sustitución conservativa. (.) Sustitución semiconservativa.

Sobre la secuencia de la II- VCa^{2+} -ATPasa de *T. evansi* alineada en la figura 44, se resaltan los posibles dominios TM de alta confiabilidad, predichos por los programas **TopPred**, los cuales corresponde con los dominios TM de la PMCA4B. Adicionalmente, se señalan los posibles dominios de unión a CaM, predichos por el programa "**Calmodulin target Database**", los cuales en esta oportunidad, y a diferencia de lo ocurrido con la secuencia de I- VCa^{2+} -ATPasa, ninguno de ellos coincide con el de la PMCA 4B y se encuentra en una región predicha como TM, la cual está alejada de la región C-Terminal. Estos resultados muestran diferencias entre las VCa^{2+} -ATPasa de *T. evansi* y sugerir que la II- VCa^{2+} -ATPasa, no presente regulación por CaM. Este alineamiento nos permitió sugerir el modelo mostrado en la figura 45.

Modelo Topológico de la posible Ca^{2+} -ATPasa vacuolar de *Trypanosoma evansi*

El modelo propuesto, nuevamente presenta más del 80% de la misma expuesto hacia la cara citosólica del parasito similar a lo que ocurre en el modelo propuesto para la posible PMCA (Fig. 36). Por otra parte, se puede observar en la figura 45, la presencia de las tres regiones citoplasmáticas y los dominios de Fosforilación (P) y de unión a ATP (N). Al igual que lo ocurrido con posible PMCA de *T. evansi*, esta enzima presenta un dominio putativo de unión a CaM en el segundo dominio citosólico. Una diferencia significativa de este modelo con respecto al propuesto para la posible PMCA de *T. evansi* es que este no posee un dominio de unión a CaM en el extremo C-Terminal tan largo.

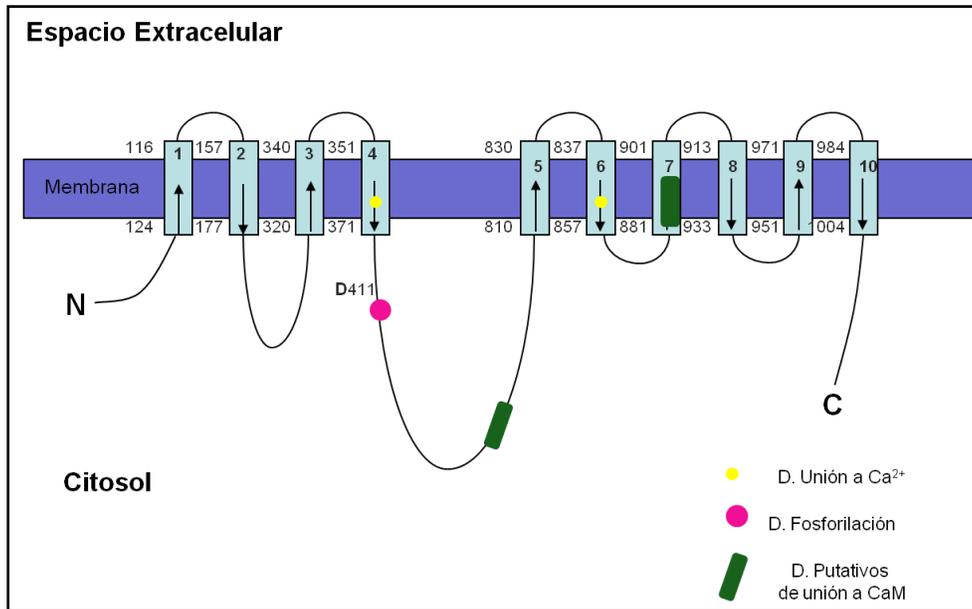


Figura 45. Modelo topológico de posible Ca^{2+} -ATPasa tipo vacuolar de *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios Transmembrana encontrados en la secuencia de PMCA de *T. evansi* predicha por los programas TopPred y HMMTOP. Las flechas indican la orientación de los dominios transmembrana. También se destacan sobre el modelo los posibles dominios de Fosforilación de unión a Ca^{2+} y posible dominio no clásico de unión a CaM.

Posteriormente, procedimos a modelar tridimensionalmente la secuencia obtenida, usando para ello el servidor Phyre 2. El modelo tridimensional predicho se muestra en la figura 46, en esta oportunidad cubrió un 97% de la secuencia de *T. evansi*, con una confiabilidad superior al 90%. Igualmente, el servidor selecciono los mismos 6 plantados, como molde, para predecir el posible modelo tridimensional de II- VCa^{2+} -ATPasa. En este modelo, se observó una conservada homología estructural, con respecto a la de la posible PMCA de *T. evansi*. En la figura se resaltan los dominios P, N y A, así como de las regiones TM.

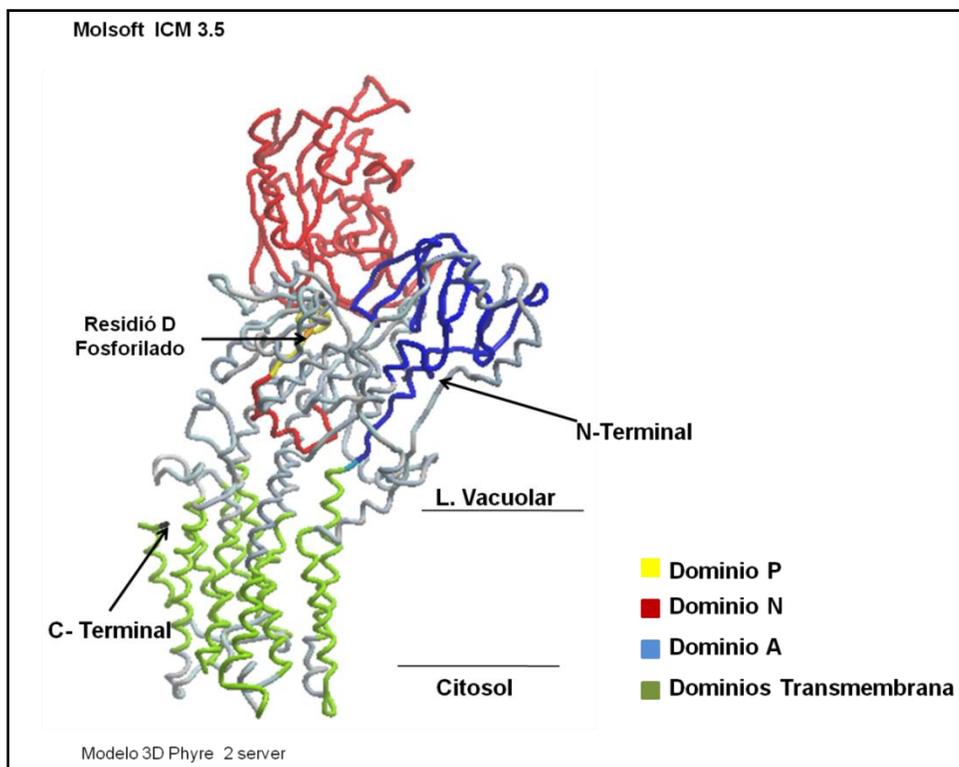


Figura 46. Modelo tridimensional de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo vacuolar de *Trypanosoma evansi*. Posible modelos 3D de V- de II- VCa^{2+} -ATPasa *T. evansi* obtenida a través del servidor Phyre y visualizado en el programa Molsoft. En la figura se destacan posibles dominios P (Residuo D en amarillo) N (rojo) A (azul), y regiones transmembrana (verde).

4.2.2.2.3. Caracterización molecular de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*

A continuación realizamos la caracterizar molecularmente de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco-endoplasmático (SERCA) de este parásito. Para ello, utilizamos el mismo procedimiento empleado anteriormente, a través del uso de programas de análisis *in silico* para la determinación de la estructura primaria, secundaria y terciaria.

Amplificación por PCR y secuenciación de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*

En la figura 47 A, podemos observar una tabla que contiene los pares de oligos DC y SE diseñados y las temperaturas óptimas de hibridación obtenidas para el PCR, así como los tamaños de los productos esperados a partir de las secuencias de SERCA de *T. brucei*. En la figura 47 B se muestran los productos de amplificación por PCR, para de

cada par de oligos empleados, los cuales presentaron tamaños similares a los esperados en *T. brucei*. Estos productos fueron purificados y secuenciados. Cada una de las secuencias obtenidas para los productos de PCR fueron analizadas con el programa **BioLing**", obteniéndose la secuencia nucleotídica consenso (Fig. 48), la cual se tradujo a su correspondiente secuencia aminoacídica (Fig. 49).

La secuencia traducida fue analizada mediante el programa **Compute PI/Mw**, empleando el servidor **ExPASy Proteomics** (Gasteiger y col., 2005), el cual predijo una proteína contentiva de residuos 1010 aminoacídicos y con una masa molecular aparente de 110.2 KDa y un punto isoeléctrico de 6.14.

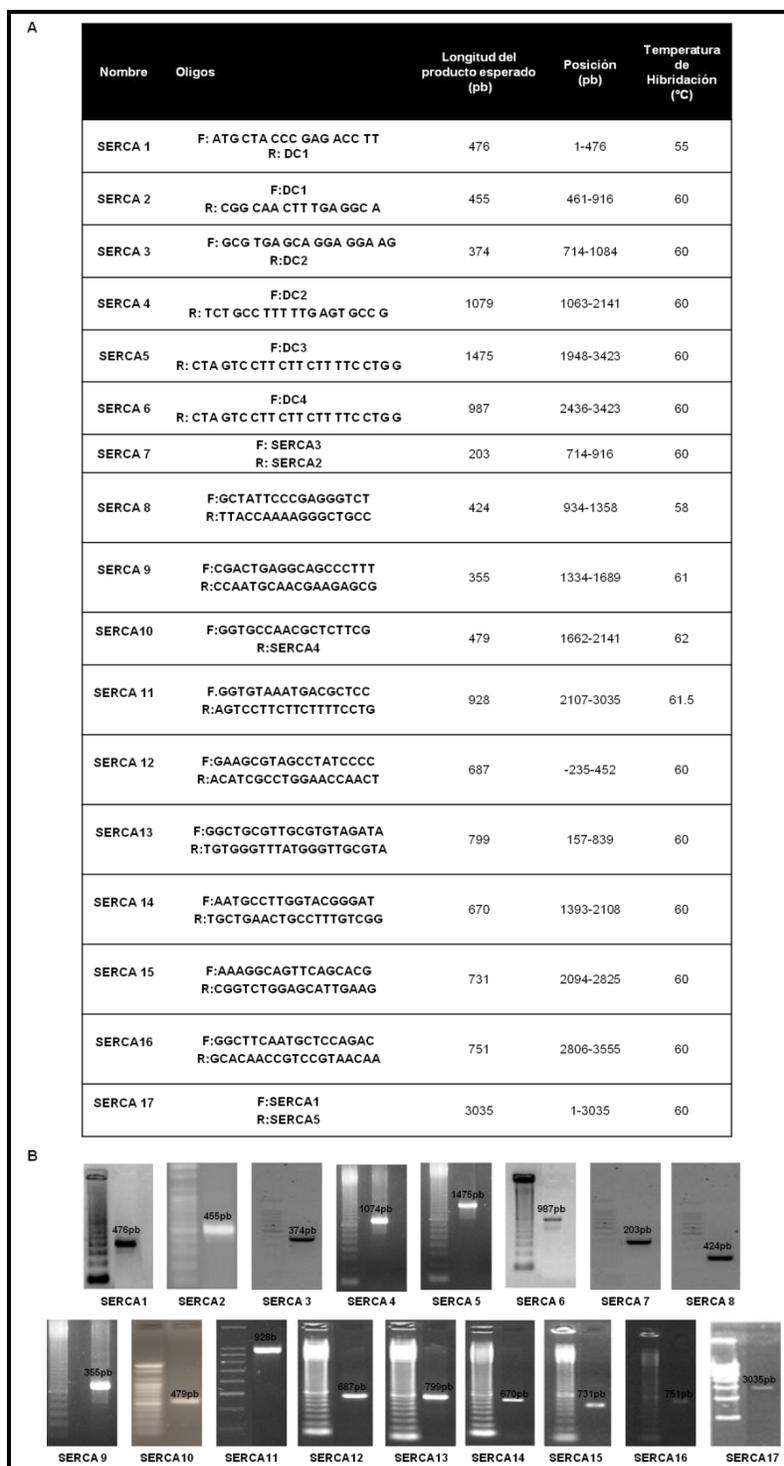


Figura 47. Productos de PCR de posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA *Trypanosoma evansi*. Amplificación de productos de PCR para posible SERCA en *T. brucei*, los tamaños de productos esperados en *T. brucei*, la posición amplificada y la temperatura de elongación utilizada. **B.** Análisis por electroforesis en geles de Agarosa de los productos de amplificación para cada uno de los pares de oligos diseñados contra posible SERCA en *T. evansi*. Geles de agarosa al 2% para productos esperados inferiores a 1000pb. Geles de agarosa al 1% para productos entre 1000 y 1500 pb y geles de agarosa al 0.8% para productos superiores a 1000pb.

ATGCTACCCGAGAACCTTCCGACCGACCCCGCGGCGATGACACCTGCGGCGGTGGCGGCTGCGTTGCGTGTAG
 ATACGAAGGTTGGACTGAGTTCACACGAGGTGGAGGAACGTCGCCAAGCGTTTGAATAAACGAAGTCCCAAGT
 GAACCACCAACACCATTTTGAAGCTAGTGTGGCCAGTTTGAAGATACGCTCGTCCGTTATCTTCTGTTGGCTG
 CGACAGTAAGTTTTGCCATGGCCGTTTGGAGAAACGCCGACAGACTTTGTAGAGCCGTTTCATCATTTTACTCAT
 TCTCATTCTCAATGCTACCGTTGGGGTTTTGGCAGGAAACCGTGCAGGAGGGGGCTATTGAAGCGCTCAAATCATT
 TGTGCCTAAAACCGCCGTTGTTCTTCGTGATGGAGACATCAAACCGTTAATGCGGAGGAGTTGGTTCCAGGCCA
 TGTCGTTGAGGTTGCTGTTGGCAATCGAGTCCCTGCAGATATGCGTGTGTGGAGTTACATAGCACGACACTCCG
 CGCTGATCAATCTATTCTTAATGGTGAGTCCGTGGAGGCGATGAAACAAATCGAAGCAGTGAAGGACGACAGGA
 GCGGTTTTCCAGCTTGTATGGTTTACAGCGGTAAGTCTATCGTTTACGGCAAAGCGCTATGTGTAGTCGTTCCGACT
 GGTGCCTCGACAGAGATCGGAACGATTGAGCGCGACGTGCGTGAGCAGGAGGAAGTAAAGACACCACTCCAGGT
 TAACTGGATGAGTTTGGTGTGCTCTTGTGCAAGGTCATTGGGTATATTTGCTTGTGTTTCCGCGTTAACCTG
 GTGCGCTGGTACGCAACCCATAAACCCACAAAGAATGAGACGTTTTTACGCGGTACATTACAGCTAGTGTGCAC
 TGCCTCAAAGTTGCCGTTGCACCTTGCAGTTGCGGCTATTCGCCGAGGGTCTTCCCGCGGTTGTGCAACTTGTCTG
 GCACTGGGGACTCGACGGATGGCGCAGCACAATGCCTTGGTACGGGATCTTCCAAGCGTAGAGACACTGGGTCG
 CTGCACTGTCAATTTGCTCGGATAAAACGGGAACACTTACAACGAACATGATGTCTGTTTTGCATGCCTTTACTCTTA
 AGGGGGACGGGAGCATCAAGGAATATGAGTTGAAAGACTCCAGGTTTAACTTGTGTCAACCTCTGTGACATGCC
 AAGGAAGACAAGTTCACCGCTGGAGCAAGTGGTCCCTCACCAAGGTTGCGAACATGCTTTGCA
 ACGATGCATCCCTGCACCACAACGCAGCCACAGGTCAGGTTGAGAAGATTGGCGAAGCGACTGAGGCAGCCCTT
 TTGGTAATGAGTGAGAAATTCGCAAATATAAAAGGTGACTCTGCGGTAACGCCTTCCGTACACTTTGCGAGGGG
 AAATGGAAAAAGAATGCCACATTGGAGTTCACGCGCAAGCGTAAGTCGATGAGTGTGCACGTCACAAGCACAGTA
 ACGGGATACCGGCCTCAAGCACAAAACATCTTTTGTGAAGGGAGCACCGGAAGAGGTCTTGCCTCGTTCCACA
 CACGTCATGCAGGACAATGGTGCCGTTGTACAACCTCAATGCCACACACCGGAAGCGCATTATAGAACAATGGAC
 AAAATATCAGGTGGTGCCAACGCTCTTCGTTGCATTGGATTTGCCTTTAAACCGACAAAGGCAGTTCAGCAGCTGC
 GCCTGAACGATCCTGCAACTTTGAGGATGTGCAATCTGACCTTACATTTGTTGGTGCATGCGGTATGCTTGACCC
 GCCACGTGAGGAAGTGCAGCATGCTATCGTGAAGTCCCGCACCGCGGCGCATCCGTGTTGTCATCATCACTGGAG
 ACCGCAAGGAGACGGCGGAAGCGATTGCTGCAAACTGAGGACTATTGTCTTACAGCGGACACACTGGGCTG
 AGTTATACGGGACAAGAGCTCGATGCAATGACACCGGCGCAGAAACGTGAAGCAGTATTGACAGCCGACTTTTTC
 AGTCCGACGGATCCATCCCACAAGATGCAGCTTGTGCAACTACTGAAGGATGAGCGACTCATTGCGCTATGACA
 GGTGATGGTGTAAATGACGCTCCGGCACTCAAAAAGGCAGATATTGGTATTGCCATGGGAAGTGGAAACCGAGGT
 GCGAAAATCAGCGAGTAAAATGGTCTTGCAGCAGCAACTTTGCCACCGTTGTCAAAGCGGTGCAAGAAGGAC
 GAGCCATCTACAACAACAAAACAGTTCATCCGGTACCTTATCAGCAGTAACATTGGTGAGGTTGTGTGCATCCT
 TGTAACAGGCCTCTTCGTTTACCTGAGGCGCTCTCACCAGTCAACTCCTGTGGGTAATCTTGTACAGATGGT
 CTTCCCGCAACTGCCCTTGGCTTCAATGTCCAGACCGGCAGATCATGGAGCAGAGGCCGCGCCGCATGGAAGA
 GCCGATTGTGAACGGCTGGTTGTTATGCGCTACATGCGTATTGGTGTATACGTTGGACTGGCTACAGTCCGTTGG
 GTTCTTTGGTGGTTCTGCGACATGGCTTCACTGGCATGACTTAACCACGTACACGGCATGCAGTGACATGCAG
 GAACGGCACTTGTGCTTCTTCTGTAACCCGACAGCGGCGAGGCCATCGCCCTCTCCATTCTCGTCGTGGTTGA
 GATGTTGAACGCACTGAATGCAGTGCAGGAAAATGCCTCGCTCATCGTGTCCCGACCAAGCAGCAATGTGTGGCT
 TCTTTTCGCTATTTTTTTCATCTCTTCTGCACTAATCATAATGTACGTGCCGTTCTTTGCCAAGCTGTTCAACAT
 TGTGCCACTCGGAGTAGATCCGCATGTTGTGCAACAGGCACAGCCGTGGAGTATTCTCACCCCAACAACTTTGA
 TGAAGTGGAAAGCGGTGATTGTGTTAGCGTACCAGTCACTTTCTTGAAGAATTGCTGAAGTTTATTACGCCCGT
 ATGGAGATGCCCCACGAAAAGAAGGACTA

Figura 48. Secuencia nucleotídica de la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*. Secuencia consenso para posible SERCA de *T. evansi* obtenida a partir de los productos secuenciados. El ensamblaje de la secuencia se realizó en el programa BioLing (Alinment and multiple contig editor 2000-2005)

10	20	30	40	50	60
MLPENLPTDP	AAMTPAAVAÄ	ALRVDTKVGL	SSNEVEERRQ	AFGINELPSE	PPTPFWKLVL
70	80	90	100	110	120
AQFEDTLVRI	LLLAATVSFA	MAVVENNAAD	FVEPFIIILLI	LILNATVGVW	QENRAEGAIE
130	140	150	160	170	180
ALKSFVPKTA	VVLRDGDIKT	VNAEELVPGD	VVEVAVGNRV	PADMRVVELH	STTLRADQSI
190	200	210	220	230	240
LNGESVEAMK	QIEAVKGRQE	RFPACMVYSG	TAIVYGKALC	VVVRTGASTE	IGTIERDVRE
250	260	270	280	290	300
QEEVKTPLOV	KLDEFGVLLS	KVIGYICLVV	FAVNLVRWYA	THKPTKNETF	FTRYIQPSVH

310	320	330	340	350	360
CLKVAVALAV	AAIPEGLPAV	VTTCLALGTR	RMAQHNALVR	DLPSVETLGR	CTVICSDKTG
370	380	390	400	410	420
TLTTNMMSVL	HAFTLKGDGS	IKEYELKDSR	FNIVSTSVTC	EGRQVSSPLE	QDGALTKVAN
430	440	450	460	470	480
IAVLCNDASL	HHNAATGQVE	KIGEATEAAL	LVMSEKFANI	KGDSAVNAFR	TLCEGKWKKN
490	500	510	520	530	540
ATLEFTRKRK	SMSVHVTSTV	TGSPASSTNN	LFVKGAPEEV	LRRSTHVMQD	NGAVVQLNAT
550	560	570	580	590	600
HRKRIIEQLD	KISGGANALR	CIGFAFKPTK	AVQQLRLNDP	ATFEDVESDL	TFVGACGMLD
610	620	630	640	650	660
PPREEVRDAI	VKCRTAGIRV	VIIITGDRKET	AEAICCKLGL	LSSTADTTGL	SYTGQELDAM
670	680	690	700	710	720
TPAQKREAVL	TAVLFSRTDP	SHKMQLVQLL	KDERLICAMT	GDGVNDAPAL	KKADIGIAMG
730	740	750	760	770	780
SGTEVAKSAS	KMVLADDNFA	TVVKAVQEGR	AIYNNTKQFI	RYLISSNIGE	VVCILVTGLF
790	800	810	820	830	840
GLPEALSPVQ	LLWVNLVTDG	LPATALGFNA	PDRDIMEQRP	RRMEEPIVNG	WLFMRYMVG
850	860	870	880	890	900
VYVGLATVGG	FLWWFLRHGF	SWHDLTTYTA	CSDMTNGTCL	LLANPQTARA	IALSILVVVE
910	920	930	940	950	960
MLNALNALSE	NASLIVSRPS	SNVWLLFAIF	SSLSLHLIIM	YVPFFAKLFN	IVPLGVDPHV
970	980	990	1000	1010	
VQQAQPWSIL	TPTNFDDWKA	VIVFSVPVIF	LEELLKFITP	RMEMAHEKKK	D

Figura 49.- Secuencia aminoácídica de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*
 Secuencia aminoácídica de posible SERCA en *T. evansi*. Programa Compute PI/Mw" (Gasteiger y col., 2005)

Caracterización de los dominios funcionales presentes en la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*

Con el propósito de evaluar posible dominios funcionales sobre la secuencia, utilizamos el programa **InterProScan**. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 50, donde se muestra la presencia de los DC característico de las ATPasa tipo P, tales como: un dominio E1-E2, ubicado entre los aa 96 y 347, predicho por la base de datos PFAM (morado); un dominio citosólico A, ubicado entre los aa 120 y 238, predicho por la base de datos GENE 3D (lila); un dominio de fosforilación P, ubicado entre los aa 357y 363, predicho por la base de datos PROSITE (amarillo) y un dominio N, dominio de unión

de nucleótido entre los aa 345 y 601, predicho por GENE 3D (lila). Adicionalmente, la secuencia presentó 6 dominios que la identifican como transportadora de cationes, los cuales se encuentran ubicados entre los aa 177-191, 355-369, 594-605, 616-626, 700-719 y 723-733, predicha por la base de datos PRINT (verde claro) y un dominio de Hidrolasa, ubicado entre los aa 352-714), predicho por la base de datos PFAM (morado). Así como solo 5 posibles dominios TM, sobre la base de datos TMHMM (verde).

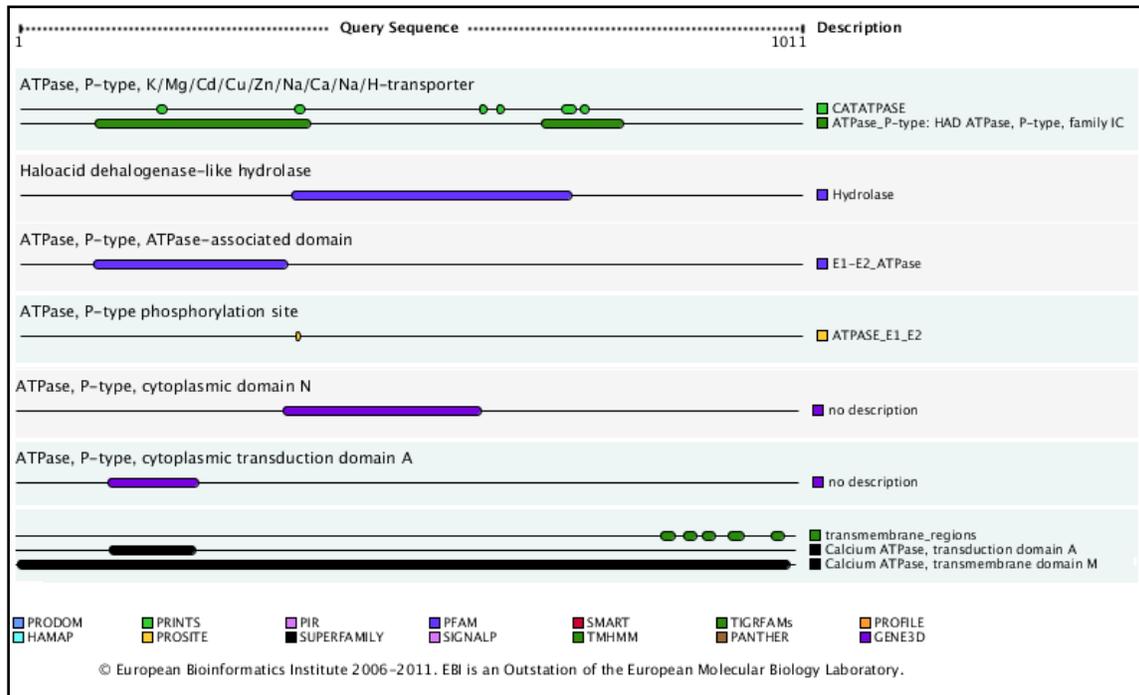


Figura 50. Dominios funcionales presentes en la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios conservados encontrados en la secuencia de II-V- Ca^{2+} -ATPasa de *T. evansi*. Este esquema fue arrojado por el programa InterproScan. Los colores mostrados en el esquema corresponden a las bases de datos donde fue encontrado dicho dominio.

Identificación de posibles dominios transmembrana presentes en la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*

El programa **InterproScan** solo predijo 5 de los 10 dominios TM característicos de la ATPasa tipo P. Por lo tanto, procedimos a analizar la secuencia de SERCA con otros programas de predicción de dominios TM, el **TopPred** y el **HMMTOP**. El primero predijo 12 dominios TM, con valores de hidrofobicidad mayores que el punto de corte bajo (línea verde Fig. 51), de los cuales 7 presentan una alta confiabilidad (M1 – M7). El segundo programa determinó la selección realizada, ya que predijo los 10 dominios TM

característicos. La posición de los dominios TM sobre la secuencia obtenida para SERCA, arrojadas por estos programas se muestra en la tabla 17.

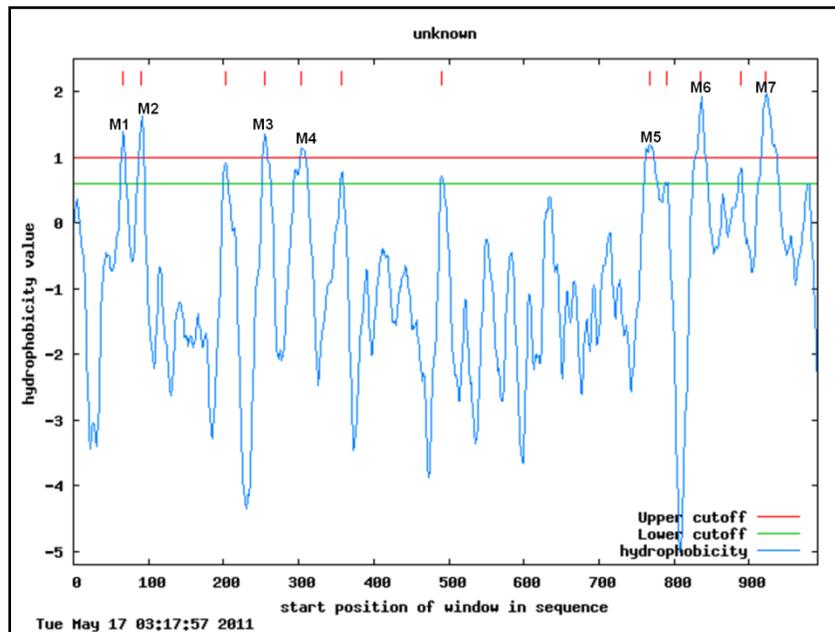


Figura 51. Posibles dominios transmembrana presentes en la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios Transmembrana encontrados en la secuencia de PMCA de *T. evansi*. Este esquema fue arrojado por el programa TopPred. Valor superiores a 1 (línea roja) sugieren dominios transmembrana altamente confiables. Valores entre 0.6 y 1 (línea verde) sugieren posibles dominios transmembrana.

Tabla 17. Posibles dominios transmembrana de posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*

Dominios Transmembrana PMCA4b	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (InterProScan)	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (TopPred)	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (HMMTOP)
M1	-	66-86	67-84
M2	-	91-111	91-110
M3	-	203-223*	204-223
M4	-	255-275	254-273
M5	-	304-324	304-323
M6	836-856	358-378*	-
M7	866-884	491-511*	-
M8	890-908	768-788	791-808
M9	923-945	791-811*	837-856
M10	980-998	836-856	887-905
M11		889-909*	926-949
M12		923-943	980-999

Análisis de la presencia de dominios de unión a CaM en la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de Trypanosoma evansi

La ausencia de un dominio convencional de unión a CaM y por ende la falta de estimulación de la actividad ATPasa por CaM, es característicos de las SERCAs. Aunque, el análisis de SERCA de *T. evansi* por el programa **InterProScan** no predijo la presencia de un dominio convencional de unión a CaM, se procedió a buscar posibles dominios no convencionales de unión a CaM y determinar su ubicación, para corroborar la posible falta de estimulación característica. Para ello, utilizamos nuevamente el programa “**Calmodulin target Database**”, cuyo análisis sobre la secuencia de SERCA de *T. evansi* arrojó los resultados mostrados en figura 52. En la cual, podemos observar solo la presencia de una región de alta confiabilidad (valores de 9), de 14 residuos aminoacídicos, ubicada entre los aa 465 al 479 y ninguna posible región hacia el extremo C-terminal de la enzima. Estos resultados indican la falta de estimulación de la actividad ATPasa por CaM, mediante el mecanismo clásico de bisagra.

.. 451	LVMSEKFANI	KGDSAVNAFR	TLCEGKWKKN	ATLEFTRKRK	SMSVHVTSTV
.....	0000001123	4556788999	9999999876	5443211100	0000000000
.. 501	TGSPASSTNN	LFVKGAPPEV	LRRSTHVMQD	NGAVVQLNAT	HRKRIIEQLD
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0111111123	4566666666
.. 551	KISGGANALR	CIGFAFKPTK	AVQQLRLNDP	ATFEDVESDL	TFVGACGMLD
.....	6544444432	1100000000	0000000000	0000000000	0000000000
.. 601	PPREEVRDAI	VKCRTAGIRV	VIITGDRKET	AEAICCKLGL	LSSTADTTGL
.....	0000111112	3444444444	4444333321	1000000000	0000000000
.. 651	SYTGQELDAM	TPAQKREAVL	TAVLFSRTDP	SHKMQLVQLL	KDERLICAMT
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
.. 701	GDGVNDAPAL	KKADIGIAMG	SGTEVAKSAS	KMVLADDNFA	TVVKAVQEGR
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
.. 751	AIYNNTKQFI	RYLISSNIGE	VVCILVTGLF	GLPEALSPVQ	LLWVNLVTDG
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
.. 801	LPATALGFNA	PDRDIMEQRP	RRMEPIVNG	WLFMRVMVIG	VYVGLATVGG
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
.. 851	FLWWFLRHGF	SWHDLTTYTA	CSDMTNGTCL	LLANPQTARA	IALSILVVE
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
.. 901	MLNALNALSE	NASLIVSRPS	SNVWLLFAIF	SSLSLHLIIM	YVPFFAKLFN
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
.. 951	IVPLGVDPHV	VQQAQFWSIL	TPTNFDDWKA	VIVFSVPVIF	LEELLKFITP
.....	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
.. 1001	RMEMAHEKKK	D			
.....	0000000000	0			

Figura 52. Dominios no convencionales de unión a Calmodulina presentes en la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de Trypanosoma evansi. La figura muestra el análisis de la secuencia de una posible SERCA en *T. evansi* en el programa “**Calmodulin target Database**”. El programa evalúa la secuencia asignando valores entre 0 y 9, donde 9 representa un posible dominio de unión a CaM.

Análisis de similitud y homología de la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*

Una vez obtenida la secuencia para la SERCA de *T. evansi*, procedimos a realizar un BLAS, para determinar la similitud y homología de la secuencia con otras proteínas en la base de datos de la NCBI. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 18. La cual, lista las primeras 10 proteínas, con mayor puntaje de similitud. Se puede observar que la secuencia obtenida para *T. evansi* se asemeja a una serie de SERCAs descrita en diferentes tripanosomatideos, resaltadas en rojo, las proteínas con mayor similitud encontradas en *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania major*. Se observa que el mayor puntaje 2063, correspondiente al 100 % de cobertura, con una ATPasa tipo P translocadora de Ca²⁺ en *T. brucei* (número de acceso NCBI XP 845010.1), secuencia originalmente utilizada para el diseño de los oligos (Tb927.53400), caracterizada como SERCA por Luo y col. 2004.

Posteriormente, procedimos a alinear la secuencias de *T. evansi*, junto con las secuencias de mayor similitud en los diferentes tripanosomatidios, *T. brucei* (GI: 72389430) *T. cruzi* (GI: 71651087) y *Leishmania major* (GI: 76363601). En esta oportunidad incluimos en el alineamiento la secuencia de SERCA 1 obtenida a partir de músculo esquelético de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), isoforma que ya ha sido cristalizada (GI: 147903853). Los porcentajes de homología se muestran en la tabla 19, donde se observar que la secuencia para *T. evansi* comparte una homología del 99% con la secuencia reportada en *T. brucei* y un 76, 65 y 48 % de homología con la secuencia reportada para *T. cruzi*, *Leishmania major* y SERCA 1 de Conejo respectivamente.

Tabla 18. Secuencias homologas a la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de

Trypanosoma evansi

Numero De acceso	Descripción	Puntaje maximo	% Query
XP_845010.1	calcium-translocating P-type ATPase <i>Trypanosoma brucei</i>	2063	100%
CBH11339.1	calcium pump, putative; calcium-translocating P-type ATPase <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	2060	100%
A45598	H ⁺ -exporting ATPase (EC 3.6.3.6) <i>Trypanosoma brucei</i>	2060	100%
P35315.1	Probable calcium-transporting ATPase; <i>Trypanosoma brucei</i>	2055	100%
XP_814228.1	calcium-translocating P-type ATPase <i>Trypanosoma cruzi strain CL Brener</i>	1592	99%
AAD08694.1	SERCA-type calcium-ATPase	1549	99%

	<i>Trypanosoma cruzi</i>		
AAV65111.1	sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase <i>Leishmania donovani</i>	1351	98%
XP_888512.1	organelle-type calcium ATPase <i>Leishmania major strain Friedlin</i>	1341	98%
XP_001561691.1	calcium-translocating P-type ATPase <i>Leishmania braziliensis</i>	1323	99%
XP_001462838.1	calcium-translocating P-type ATPase <i>Leishmania infantum</i>	1305	98%
AAC47505.1	organelle-type Ca ²⁺ -ATPase <i>Leishmania amazonensis</i>	1233	98%
XP_001652085.1	calcium-transporting atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type (calcium pump) <i>Aedes aegypti</i>	914	98%

Tabla 19. Porcentaje de homología entre secuencias alineadas con la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi* (ClustalW2 EBI Bioinformatics)

SeqA	Nombre	Longitud	SeqB	Nombre	Longitud	% de Homología
1	<i>T.evansi</i>	1011	2	<i>T.brucei</i>	1011	99.0
1	<i>T.evansi</i>	1011	3	<i>T.cruzi</i>	1006	76.0
1	<i>T.evansi</i>	1011	4	<i>L.major</i>	1023	65.0
1	<i>T.evansi</i>	1011	5	SERCA1	1001	48.0
2	<i>T.brucei</i>	1011	3	<i>T.cruzi</i>	1006	77.0
2	<i>T.brucei</i>	1011	4	<i>L.major</i>	1023	66.0
2	<i>T.brucei</i>	1011	5	SERCA1	1001	48.0
3	<i>T.cruzi</i>	1006	4	<i>L.major</i>	1023	66.0
3	<i>T.cruzi</i>	1006	5	SERCA1	1001	49.0
4	<i>L.major</i>	1023	5	SERCA1	1001	48.0

La figura 53, muestra el alineamiento correspondiente a la tabla 19, en ella se destacan sobre todas las secuencia de SERCA, los DC de que la caracterizan como miembro de la familia de las Ca²⁺-ATPasas, los cuales están altamente conservados entre todas las especies evaluadas. Entre los dominios resaltados se encuentran: los dominios TM (gris), los cuales en su mayoría coinciden perfectamente en ubicación sobre la secuencia de SERCA de conejo y la de *T. evansi*, la región antigénica de reconocimiento para el anticuerpo comercial H30 (línea punteada), los residuos aminoacídicos involucrados en la unión de esta enzima a sus inhibidores clásicos (azul para Tg, lila para BHQ y rosa para CPA), residuos de alta afinidad de unión a Ca²⁺ presentes en los dominios M4, M5, M6 y M8 (E³¹⁵, E⁷⁷⁰, N⁷⁹⁵, T⁷⁹⁸, D⁷⁹⁹ y E⁹⁰⁰ en *T. evansi* identificados con *) y el dominio no convencional de unión a CaM (verde).

```

T. evansi      MLPENLPTDPAAMTPAAVAAALRVDTKVGLSSNEVEERRQAFGINELPSEPPTPFWKLVL 60
T. brucei     MLPENLPTDPAAMTPAAVAAALRVDTKVGLSSNEVEERRQAFGINELPSEPPTPFWKLVL 60
T. cruzi      MALLSLPATPSTMDASAVTKSLRVDKRGLSADEVEERRRQFGSNELPTKPSTPFWKLIL 60
L. major      MAKLVLPDDPASMDGHLICSLLEVKEARGLAQDEVDKRLHEFGKNEGSTGPSTPFWKLIV 60
SERCA1        -----MEAASHKSTEECLAYFGVSETTGLTPDQVKRHLEKYGHNELPAEEGKSLWELVI 54
               . :                : * .    ** : : * . . : * * * . :    . . : * * * :

```

```

.....
T. evansi      AQFEDTLVRIILLAATVSFAMAVVENN---AADFVEPFIIILLILILNATVGWVQENRAEG 117
T. brucei     AQFEDTLVRIILLAATVSFAMAVVENN---AADFVEPFIIILLILILNATVGWVQENRAEG 117
T. cruzi      AQFEDTLVRIILFAAMTSFVMALEFKN---AGDFVEPFIIILLILVLNATVGWVQENRAES 117
L. major      GQFEDTLVRIILLAAFVSFCLAVLESN---MMDLVEPFIIILLILTLNATVGWVQEDRAEK 117
SERCAL        EFQFEDLLVRIILLAACISFVLAWFEEGEETITAFVEPFVILLILIANATVGWVQERNAEN 114
*****:*** ** : * . * . . :*****:***** ** ***** . **

```

M1

M2

```

.....
T. evansi      AIEALKSFVPKTAVVLRDG--DIKTVNAEELVPGDVVEVAVGNRVPADMRVVELHSTTLR 175
T. brucei     AIEALKSFVPKTAVVLRDG--DIKTVNAEELVPGDLVEVAVGNRVPADMRVVELHSTTLR 175
T. cruzi      AIEALKSFVPKTAVVLRDG--KLVTVGAEDLVPGDIVEVSVGNRVPADMRVVELHSTTLR 175
L. major      AIDALKDFVPETAVVVREG--MTQRILAENLVPGDIVEIAGDRVAADVRLLTLESTTLR 175
SERCAL        AIEALKEYEPEMKGKVRADRKSVQRIKARDIVPGDIVEVAVGDKVPADIRILSIKSTTLR 174
**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

```

.....
T. evansi      ADQSILNGESVEAMKQIEAVKGRQERFP--ACMVYSGTAIVYGKALCVVVRTGASTEIGT 233
T. brucei     ADQSILNGESVEAMKQIEAVKGRQERFP--ACMVYSGTAIVYGKALCVVVRTGASTEIGT 233
T. cruzi      ADQAILNGESVEAIKEADAAIGHQDRFP--SSMVYSGTSIVYGKAQCVVVRTGAFTEIGS 233
L. major      VDQSILNGESVEAMKQVESVRVKRERFP--SSMVYRGTAIVYGKARGVVVRTGKSTEMGF 233
SERCAL        VDQSILTGESVSVIKHTEPVPDPRAVNQDKKNMLFSGTNIAAGKALGIVATTVGSTEIGK 234
.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

```

.....
T. evansi      IERDVREQEEVKTPQLQKLEDFGVLLSKVIGYICLVVFAVNLVVRWYATHKPTKNETFFTR 293
T. brucei     IERDVREQEEVKTPQLQKLEDFGVLLSKVIGYICLVVFAVNLVVRWYATHKPTKNETFFTR 293
T. cruzi      IERDVREQEEVKTPQLQKLEDFGMVLLSKVIGYICLAVFVINMVRWYSVHTPTPDEPWYER 293
L. major      IERDVREQEEVKTPQLQKLEDFGVLLSTVIGFICLVFVFNLLHWFRTHPAATEESWFER 293
SERCAL        IRDQMAATEQDKTPQLQKLEDFGEVLLSKVISLICVAVWLNIGHFNDPVGHG-----S 287
* . : : * : ***** ***** ** . * . * : * : * : * : * : * : * :

```

M3

```

.....
T. evansi      YIQPSVHCLKVAVALAVAAIPEGLPAVVTTCALGTRRMAQHNAALVRDLP SVETLGRCTV 353
T. brucei     YIQPSVHCLKVAVALAVAAIPEGLPAVVTTCALGTRRMAQHNAALVRDLP SVETLGRCTV 353
T. cruzi      FIAPAIHCLKVAIALAVAAIPEGLPAVVTTCALGTRRMARHNAALVRDLP SVETLGRCTV 353
L. major      YIEPTVHSLKVAVALAVAAIPEGLPAVVTTCALGSRKMARQNALVRDLP SVETLGRCTV 353
SERCAL        WIRGAIYYFKIAVALAVAAIPEGLPAVITTCALGTRRMAKNAIVRSLP SVETLGRCTV 347
* : : : * : ***** ***** :*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

M4

Dominio de Fosforilación

```

T. evansi      ICSDKTGTLTTNMMSVLHAFTLK-GDG---SIKEYELKDSRFNIVSTSVTCEGRQVSSPL 409
T. brucei     ICSDKTGTLTTNMMSVLHAFTLK-GDG---SIKEYELKDSRFNIVSNSVTCEGRQVSSPL 409
T. cruzi      ICSDKTGTLTTNMMSVMEIFTLG-VDG---NPREYELKDSRFNVMPNVVTCGGKPVTSAL 409
L. major      ICSDKTGTLTTNMMSVSEVVTME-VSG---KAHKYSIHDSRFNVVAAAVSHNGTPAGEAL 409
SERCAL        ICSDKTGTLTTNQMSVCKMFIIDKVDGDFCSLNEFSITGSTYAPEGEVLKNDKPIRSQQF 407
***** ***** ** . : . * . . : : . * : . : . :

```

```

T. evansi      EQDGALTKVANIAVLCNDASLHHAATGQVEKIGEATEAALLVMSEKFANIKGD----- 464
T. brucei     EQDGALTKLANIAVLCNDASLHHAATGQVEKIGEATEAALLVMSEKFANIKGDS----- 464
T. cruzi      ETDGALSMLTNAIVLCNDASLHYNTKNGQVEKIGEATEAALLVMSEKLAHATDPA----- 464
L. major      GNDAALDMVATIATLCSASLVCGRSAEVEKVGDATEAALLVMSEKLYHSAARNGVDGA 469
SERCAL        DG---LVELATICALCNDSSLDNFNETKGVYEKVGATEATETALTTLVEKMNVFNTVEVRNLSK 464
* : : . * . * . * : * . . . * : * : * : * : * : * : * :

```

D. Putativo de unión a CaM

D. Unión ATP

```

T. evansi      --AVNAFRTLCEGKWKKNATLEFTRKRKSMVHVTSTVTGSPASSTNNL FVKGAPEEVLV 522

```


SERCA1	LHFLILYVDPLPMIFKLLKAL-----DLTQWLMVLKISLPVIGLDEI	983
	** : *:* : . : .* : .*	:: : * * : : * :*** : : * :
		M10
<i>T. evansi</i>	LKFITPRMEMAHEKKKD-----	1011
<i>T. brucei</i>	LKFITRRMEKAQEKKD-----	1011
<i>T. cruzi</i>	LKYITRHMQASRNKKN-----	1006
<i>L. major</i>	LKLFSRCSNHHRENYSAEWVVGMSRM	1023
SERCA1	LKFIARNYLEDPEDERRK-----	1001

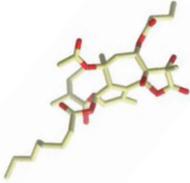
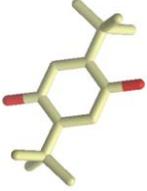
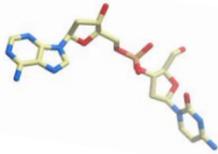
Figura 53.- Alineamiento de la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi* con SERCAs reportadas en otros tripanosomatídios y SERCA de humanos. Alineamiento realizado con el programa ClustalW2 de EBI. En la secuencia se resaltan los dominios transmembrana (gris claro), dominio de fosforilación donde se destaca en rojo el residuo de Ac. Aspártico (Amarillo), Dominio de unión a ATP (Verde), Dominio de unión al anticuerpo H300 (línea punteada). Residuos involucrados en la unión a Tg (Azul). Residuos involucrados en la unión a CPA (Rosa exceptuado el residuo D 89 de *T. evansi* el cual esta azul). Residuos involucrados en la unión a BHQ (morado exceptuado el residuo D 59 de *T. evansi* el cual esta morado). Los residuos de alta afinidad de unión a Ca²⁺ presentes en los dominios M4, M5, M6 y M8 identificados con (*). Las secuencias utilizadas en el alineamiento corresponden: *T. evansi* (secuencia problema). *T. brucei* (GeneDB # 927.53400 NCBI # XP 845010.1 GI: 72389430). *Leishmania major* (# NCBI XP 888512.1 GI: 76363601 *T. cruzi* (# NCBI XP 814228.1 GI: 71651087) y SERCA 1 (#NCBI NP777616.1 GI:)

Dominios de Interacción de la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi* con inhibidores clásicos de SERCA

Resultados previamente mostrados, nos sugieren la presencia de un reservorio de Ca²⁺ dependiente de ATP sensible a Tg y BHQ, ambos inhibidores clásicos de ATPasas tipo SERCA en eucariotas superiores. Por su parte, el CPA otro inhibidor clásico de SERCA no mostro efecto alguno sobre los niveles de Ca²⁺ citoplasmático en parásitos de *T. evansi* enteros y cargados con Fura. Estos resultados generan una controversia con respecto al efecto de estos inhibidores (Tg y CPA) en otros tripanosomatídios como *Leishmania* y *T. cruzi* en donde los mismos tienen un efecto antagónico al nuestro. Por tal motivo, nos propusimos estudiar las posibles diferencias en los dominios que interaccionan con estos inhibidores en nuestra secuencia así como en las secuencias de los demás tripanosomatídios usados en el alineamiento de la figura 53.

En la Tabla 20 se muestra los dominios de interacción de estos tres inhibidores en eucariota superiores así como la ubicación de estos dominios en *T. evansi*. Por su parte la figura 53 se resalta los residuos involucrados en la interacción con los inhibidores. Como se puede observar en la figura todos los aminoácidos involucrados en la unión de la enzima con los tres inhibidores están presente no solo en *T. evansi* sino que están presentes en *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania*.

Tabla 20. Dominios Involucrados en la Inhibición de SERCA

Inhibidor	Estructura	Dominios Involucrados	Residuos Involucrados	Posibles Residuos Involucrados <i>T.evansi</i>
Tg		M3 M5 M7	F (256) Q (259) I (761) F (834)	F (255) L (258) I (760) F (833)
BHQ		M1 M4	D (59) L (61) V (62) L (65) P (308) E (309) P (312) D (254)	D (65) L (67) V (68) L (71) P (314) E (315) P (318) D (253)
CPA		M1 M2 M3 M4	Q (56) D (59) N (101) D (254)	Q (62) D (65) N (104) D (253)

Modelo topológico de la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*

Los resultados de los análisis *in silico* de la secuencia de SERCA de *T. evansi* nos permitió proponer el modelo mostrado en la figura 54 donde se puede observar los 10 dominios transmembrana característicos de la familia de P-ATPasas. En el esquema también están representados: el dominio de fosforilación (rosa) resaltándose el residuo de Ac. Aspártico involucrado en este proceso, los sitios de unión de Ca²⁺ (amarillo) así como el dominio putativo de unión a CaM predicho por el programa “*Calmodulin target Database*”, resaltándose en esta oportunidad que la localización de este dominio putativo de unión a CaM no está en su posición clásica (extremo c-terminal) como ocurre con la posible Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA descrita anteriormente. El modelo, por su parte muestra que más del 80% de la enzima se expone hacia el citoplasma.

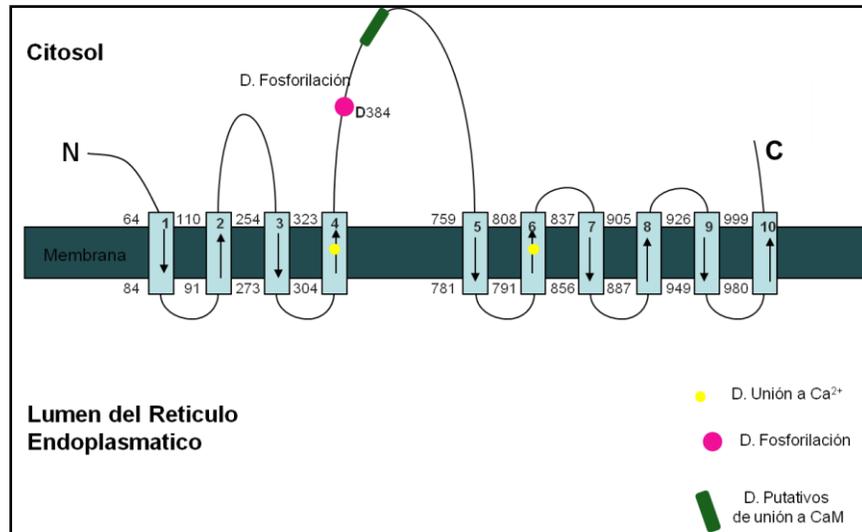


Figura 54. Modelo Topológico de la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios transmembrana encontrados en la secuencia de SERCA de *T. evansi* predicha por los programas Topred y HMMTOP. Las flechas indican la orientación de los dominios transmembrana. También se destacan sobre el modelo los posibles dominios de Fosforilación (rosa) de unión a Ca²⁺ (amarillo) y posible dominio no clásico de unión a CaM (verde).

La secuencia obtenida para SERCA de *T. evansi*, fue enviada al servidor “Phyre” **Protein homology analogy recognition engine** (Kelley y Sternberg, 2009), el cual nos arrojó el modelo tridimensional mostrado en la figura 55. El servidor, en esta oportunidad, utilizó, un único templado, el cual corresponde al número PDB C3b9bA para la Ca²⁺-ATPasa de retículo sarcoplasmático de musculo esquelético de conejo obtenido por difracción de rayos X (Olesen y col.,2007). La secuencia de SERCA de *T. evansi* mostró un 100% de confianza con el templado utilizado. Comparando los tres modelos (A, B y C) mostrados en la figura 58, podemos observar una gran similitud en la estructura tridimensional y distribución de los dominios P, N y A, así como de las regiones transmembrana.

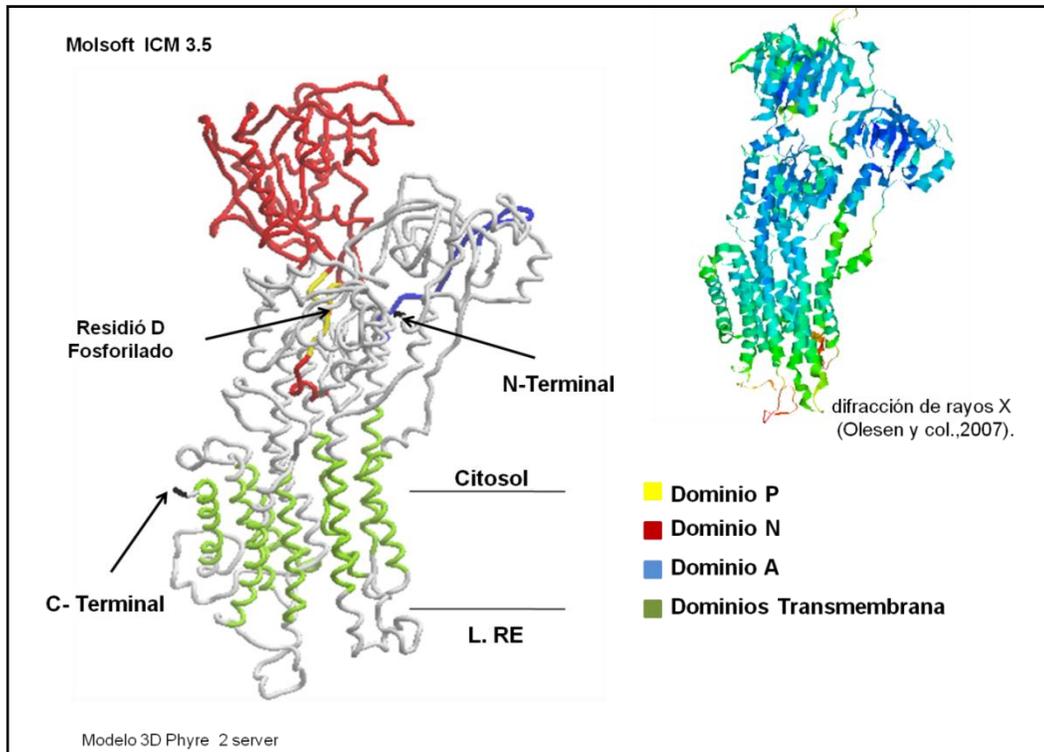


Figura 55. Modelo Tridimensional de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA de *Trypanosoma evansi*. Modelo 3D de posible SERCA de *T. evansi* obtenida a través del servidor Phyre y visualizado en el programa Molsoft. En la figura se destacan posibles de dominios P (Residuo D en amarillo) N (rojo) A (azul) y las regiones transmembrana (verde). En la figura se presenta también el modelo de SERCA de musculo esquelético de conejo obtenido por difracción de rayos X (PDB C3b9bA) (Olesen y col., 2007).

Una vez obtenidas las evidencias que nos permiten sugerir la posible existencia de tres Ca^{2+} -ATPasa en *T. evansi*, procedimos a caracterizar molecularmente a la presencia de un Putativo canal de Ca^{2+} en este parásito. Para ello, utilizamos el mismo procedimiento empleado con las tres previas ATPasas caracterizadas.

4.2.2.2.4. Caracterización molecular de Putativo canal Ca^{2+} de *Trypanosoma evansi*

Amplificación por PCR y secuenciación de putativo canal Ca^{2+} de *Trypanosoma evansi*

En la figura 56 A, al igual que en los casos anteriores, se muestran los oligos SE utilizados así como los tamaños de producto a esperar y las temperaturas de elongación utilizadas para la amplificación de este canal putativo. Por su parte en la figura 56B se muestran los productos de dichos PCR, los cuales presentaron tamaños similares a los predichos en *T. brucei*. Estos productos fueron nuevamente purificados a partir del gel y

mandados a secuenciar. Cada una de las secuencias fue alineada con ayuda del programa “Bioling” obteniéndose la una secuencia consenso mostrada en la figura 57.

La secuencia traducida fue nuevamente introducida en el programa “**Compute PI/Mw**” a través del servidor **ExpASY Proteomics** (Gasteiger E. y col., 2005) el cual predijo una proteína contentiva de residuos 2693 aminoacídicos y con un peso molecular aparente de 303.8 KDa y un punto isoeléctrico de 8.95 (Fig. 58).

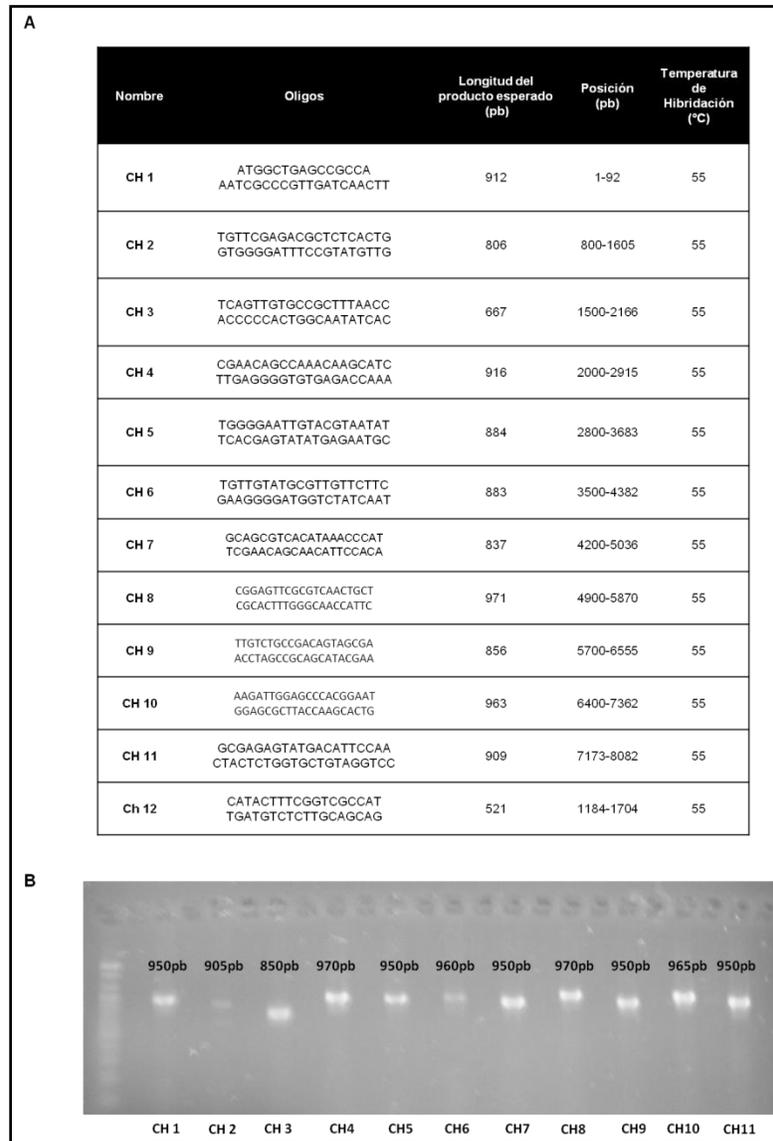


Figura 56. Productos de PCR de putativo canal de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*. Amplificación de productos de PCR para putativo canal de Ca^{2+} en *T. evansi* **A.** Tabla que muestra los pares de oligos utilizados, los tamaños de productos esperados en *T. brucei*, la posición amplificada y la temperatura de elongación utilizada. **B.** Geles de Agarosa con los productos de amplificación para cada uno de los pares de oligos diseñados contra Putativo Canal de Ca^{2+} en *T. evansi*. Gel de agarosa al 1%.

ATGGCTGAGCCGCCACCACCGCAACCACTACGTAAGGGTTTTTTCGTGCTGATCCCCATGGCCTGCGGCCACCAGAG
AGCCCTCGTGATGCTGAGGAGCCTGAAAACCATGACATTGTTGAGGATCTCCACTCCCATCCAGTCGTAACCTGGCCG
CTCCACGCTTGGCAGCCATGGGTGGCGGACCACATTGGCAGGGGCGGAAGCAGCGGCAACTTCAACATCAAAACAAC
CGGCCATACCCGGGGAGGTCCCGCGCTGCCGCGACCGGGGACTACGACTGCAGTCACATCGGCGCAATAATAAG
TCTGACTCCTCGGCAAGAACTTTTAGCAGCCACAAACAGCTGTGAGGAAAATATCCAGCTGGGTACGATAATCAA
ATGAACGTGACATCCAATGACTTTTCTCATTACAAGATACAGGGATAAAAAGAAATCGGAGATGGTGAACAGGGCTCATC
GGCGAAAACACGTTCCACGATTGCACATGCGCCAAGCGTTCGATTTTCTGAGGTAGTGCAGGAGCAGCCCCCTATCGA
ATCTGTGGAGCAGCTATGTCAGCTCCAGACTCTAGCTCATCCAGTGGAGCGCTTTTTTGTGAGTATCAACCCATGGCA
ACGCGTGGTTGCCGAGTACCCAAGTACCCGTTGAGGAGGACGAAGCTCTGTTCAATCATCTCGCGGAGTACACGGAT
GATGATCTTTCTTTTCTGATGAGTGTCTGTTCTTGAAGAAGACACACGTCGGCTCCAGAACGATCCGTTACGGGGCC
CGCTATTCTGTTCTGTGTCGAGACGCTCTCACTGCGTCCCTCACAAAGGGTGAATACCTTACGAATGGAGGATCA
GGAGCGCAGCGTCTCCCTGGTTGAAGCAAGTTTCATCAACGGGCGATTGCACCTTCACTTCTTTTATTTT
CTGCAGGTATGAAAGCTCGTGAATTGCGTACAACATTCTACACCCTGGTTGACTGAAATGTTGCTTATGTTAATCATCT
TGGTATATCCATGATGACAGCGGCTGGTCCCGAAAACATGGCCACATTGGAGAAACCGTCTTTCATGTTCTTCG
TGATGTTTTCTTCTGTGATCTACACAATCGAATTTGTCGCAAGGCTTTTTACTTCGGGCGCTGTTTCGCACTCCCGG
CATACTTCGTCGGCCTGCTCTCGACGCGAGTCTTTTGTGATGATATTGAACTGCACAACCCCAATC
GATGTGGAATTTTTCGGCATTCCGTCATTCTGTTTTGAGTTCGAGCACATACGTGCCTATTCCAATTAACATGAAGC
TGCTGGCGAAGTCGTTCTCCGTTCAACGTCCAATGGTGAAGGTGTCCACTATCCTTTTTATGTGCTGTTGTTCTTC
TCGCTCGTGGGCCTTCAGCTCTTCTCGGAGTGTCCAGCACCCTGTGTTAGTCCAACCAGAAAATGTAACAAAAC
AGGTGTCGCGCTTTAAACCAGTGAAAAAAATGAAAGTTATTACCAGGAGCTACGTGCCCTCACCCACCTTATGCGT
TGCCGACACATACGAAATCCCCACCACGGCTACCGCAGCTTTGACAGTGTGGGACACTCATTTTTATCGGCTTTCCAG
ATAATGACGTTTCAGGGCTGGACAAGCCTGCTGCAAGAGACATCAGACACTACATCAGTAGCAGCTATTCTGTACTTTTT
TTTGGCGATCTGATCTGTGCGTGGATTATCCCTAGCTTATATTTGGGAGTCTTTATTGAAAAATCGAGAAAACGAGAC
GATTGTTGTCAGAACTGCAGCTATTGACGGTATGCTACTGGAGCAGCGGCAACGATTGAATGAGGCAATCAA
GCTTCGTGATTTTGTGCAACCGCATGAAAGTGGAAAAATACGCCGACATCCAATCGAACTCATCCGGTCTGTTACCGG
AGGATTCAGAGGTGAAACTCTCGAACAGCCAAACAAGCATCGCAACTGAGTCAGAGTCGGGAGAACCAGCAGTCGTG
GTGAAAAAACCCATTGGGGACACAACAAAGGTGATCTCGCTGGACAGACGAGCAGCGTGTCAACTCCACTTTTCGC
TCACACGACAACGTGATATTGCCAGTGGGGTGAACGACGACGACGTCGTTGATCAAAAATGATGGTGAGATAAGCG
GGGAACTCGTCGCCCTCATTCTGCAACGGAAGGGATCGGATCAATAGGGGAGCGGGCATGATGGTGAACCGGGGAT
TTTGGCCTTGGAGGCCGCTGGCGTGGTCCAGCACCATCCGCTCACTCACACTATTGGTGCAGCTCACGGCACGGAC
CTTCCCCTGGCAGTTCGTCTAGATAACGAGGAAGAAGCAGTTGAGGTTCCCAAAGATTATCAAAACCCGATAGACAATGA
CATAATGAGGCGGACTAACACTTTTCGAGGACACAACGAAACTTACATCCCTCTTTCGTGCTCACCTCAACGCAGCGA
AGGGGTGGAAGCTTCGATGAGGCATCCAACACAATTCGAACAAACCAGGAAGCTGCTGGTGCATCCCAAGCCGTCAC
TCAGCCCACTGAATGGTCATAATACTAGTAGGATGGACTCCAACGGGAGTTAGATGAACCTACATCAAAGACCCAAA
CCGTATCGAAACGCGGGTCCCAATGCCGCGTTTGTCTCCGGTCAGGTACCCGAAGTTATTATCCAGCAGCCCGAAG
GCGGTGACTTCCGATTCGCTGAAACGCGTTCACAGAAGTGGGAAATTGTACGTAATATCTTGCACATGTTCCAGGAAGG
GTATCTCGCATTATTACGCAGTATATCCGTGAACATCGCGGATGCAAGCAGCGGTTTGGTCTCACGCCGCAATTAC
GTGAATAAGTACGAAGATGACGTGCTTCGGAACCTGCGGACGCGCGTGTGCTTCAAGTAAAGGAACCAGGTGCACCG
TCACAACTTCGCGCGCAAGCGGTGACGAGGAACTTGTGCAAGTGAATGGAATAAGGTTATCCTAACCGACAGCGATG
ATATTGGAGACCTGTCACCGATTCAAATGGCTACCAATATTGTTAGAAATGTACCTGTAACGCCCTTTCGGTGGCGTGTG
CTGGTTATTGTCATCGTCAACGGCATTTCACGCAACCGCGGTATTTCAGCAACCAGAATATTGGGAACTGCCCTTTT
TGCTCTTGGTATTATTTTTACGTCATTTTTCTGTCGAGATTGTTGTCCTGTCTAGGACTTCGGGCTCGTTTCATTTTT
ACTGGATTTCAACAATCTGTTGGATGTTACTGTTACAATTCTCGGGTTCGTGGAGCTCGCCTACGCACGGTCAAACGTC
GTTACAGTGCTAAACTGGGTGAGGCTTCTGCGCCTATTTGCACTTTGCCATTTGCACCTATGCGGCGGGTGTACAGG
TGCTGTTACTGGGTTCCGACAGATGTTGTATGCGTGTGTTCTTCTCAGTATCTACATGTTTATGTTGATTCTCATCGGCA
TGAGTTTTCTCGCGGTCCCAATGGCATGGTGGATCATCGTTCCAGGATTACTACAGCAGTGGAAATTTTGCACATTT
TCTGGTGTCTCATTGCTGTGTCGAGGCAATCTCATATACTCGTGAGGAATGGGTGTACCTGACGTGGAACGGCATGC
AATCTCGTGGTGAAGTACACCGTCTTTATTTTCATGGCCGTCGTCGGTGTGGCTTTTATTGCCCGCTACTTCTTCGTCGCC
GTGTTCCGCTGGGCATGGCAGAGCGAGGAAGAGGAGGAGAAACTACGCAGCAATCGCTAAAGGTGGTTTCAGGTGG
CCGACGGGAAGTTACCCGACTGCGTTGGTTTTGACTTTACTGTGTCGCTCGTTCAAGCACATACATGGAGGTTGCA
GAGGCGAGATGTTGCACCGGATGAAGTGTTCATTTGAAACGAAGATATGCGCAAAACAATTCGCATTGCGGAAGCAAAG
GAACGGTTCACAAAGAGGCCCTCGCGCAGACCGACTTGGCCATGAGTCAACGCCGGATGGGGTCTCCGATGGCCAG
CCCTTCTGCAACCATGGGATAATAACAGACGGCTACGCACCGGCGGCGCAGGTTGGCACAGCTCCTAGATATGTTAA
CGTTGGTGGGCACTGACAGTACATAAACCCATCAGTTGACTTTGTTGATGCGCAGGTTCCACCCCTTACGCGCC
ATATCCAGTTTTCAAGTGAAGAATGCGCAACTCCGGTTTCGCCCGTCGGTATAGCACCGTTCGGCTCGGTGTACACTC
CTGTAATACAAGATGATGGTATTGATAGACCATCCCTTTCAGCCGTTCAAGCCCGTCGGATGCGGGGGAGCGGAGCG
GGGAGCTTGGTGGGGAAAGTCAAGAAAATGGCCAAAGAGGGGAGACGGTCAATATTCTCCGAGGGGGGTGTCACTT
AATGGAACGGGAGGAGAGCGACTTCGACGGGCTGCAACGAAAATCAAGTGTCTTGGGCTTTTCCAGGTTGGG
GTACGATCGAGTGCAGGTAAGAAAGACGGAGGGTCAAGAAAGTAAAGCGCTCCGCCATGCAACAGCGGTGACG
GTAACGAGTTGAGGGGAGACTACGTTAACGAGGGAGAGGTCAACGGTGGCAGCATGGTGTACGAACACATTCTGTACC
CTGGGCCGCGTTACGCTACAAAACAGTAAATGCGAAACCAATACGTGCGGGTGTGAGCGTTGCTTAGATTGTAATAC
CTATCAACAGATGCCCTTTCGGGGCCCCGCCGAATGTCCAACAACGAAACCCGGAAGATTACATGCTGAACACTGTAC
ATGGCTGCTGTCGAGGTTTCGCGTAACTGGTATTGATGTCGCAAGTAAAGGTTATGTTTCGTTGCAAGAAATATTA
ACCACCGACGCGTGTGAGTTGAAACGGTACTTGGACAAGCTTGGAGTTGTGGAATGTTGCTGTTGAAACAATCGAG
TATCTCTCTGTAGTATATAGAGCAGCGGGAGTATCGAACGTGGGATCGCACACTGGAGGCGTTGCAATTTGCAACAAT
GGTTGATAGTCTGCATGTTGGGCAAGAAACAGTTTGGTCGTCACCCCTAGCCTACACATTGGCCCAAGAAAGGG
AGAAACTCGCCGGAACACAAGTCTGTTGAGCTTTCGTCGCAAGCTTCTTTCTTTTTCATATTCCTTCCGAACCCG
GTGCGTCTGTTGCAACGAGAATTATACAGTACAGATGGTTCGACATTTTTTATTCTCACTGTTATATTCATTGCGTCA
TTCACCTGATATTTTTGGTGGAGATGATAATGAAGTGGATCAGCATGGGTGTAATTCTTTCAGACCGGAGGCATCTC

TGGCACTGGTGGAAACGTTTTGATTCGTTATTGTCATTGTGTCGCTGATCGGATTGGCAGACCAACACAGCGCCCTCC
GCTCCATCAAGGTTTTGCGTTGTTTTCGGATACTTATCCCTATGCGGGTGTCCAACCTCAATAGAAGTCTTTCCAAGATCT
CGTCAGCCTTACTTGATTGCTGCCGACAGTAGCGAACATCTTCTGCTGTTTTTATCAATTAATTTGTGTGGGCTGTGC
TGGCAGTACGGCTTCTAAATGGCCTCACCCACTCTTGCAAGTATCCGTCCTTCGTCGACATTACGGCCTGCGAAGACGC
CAAACATGAATGGTTGCCCAAAGTGCCTAATTTGACTCTTTCTCCAAAGTTTGTGACAAATGATAGAGGTCAGCGTGG
GGTGAAGTGGCTGGATGTTATTTACACGGGTGTAATGGTGAACGCTGAACATGCGCCTATGGATGACCATTACCT
TGCAAGGGGATCTTCTTTCATCGTATACTATTATGCTCCACCTCATTTTGTCTCACTGTTTACTGCGTCTATGATTTAC
AGCTATCTGTTAACCAAAAATGCAGCTGAGGGAGTATTGGGGATCACGTTTGTGAGCACCAGCTTTGGATTGCGATGCAAC
GTATGACTGCAACTCAAGCCACGTGTAAAGCTTGTTCCTTTGTGCAACCACGTGTACAGTTTTTGCACAATGTTGTC
ATCCGCCCATATTTGAGGTAGTGGGTGCGAGTGACTTCTTCTCAACATTCTTACCATGGCATTGCACTGGTATGGCGA
GACTAAATCGAAGGCAAGCGTGTAGCTGCCTTTCAATATGTGTGGATGTTTTACTTTACCGTCGAGGCGCCATGAAG
ATTGAGGGCAAGGTAATGCGGGCGTTCCTCCCGTGGGCGTTTTCTTTGACTTCTCGTGTACTATTGTCCTTTATTGG
GTTAATAGTGGATGCGGCAAGTAGCGAGGGTATGCCGTTTAAAGTGAACGACTTTCGTATGCTGCGGCTAGGTCGCTTC
TTCTCCGCTGCAAAGGTTTTAAGCCGATGAGGAAGCAGTTTTCTACTGATGAAGTGTGATTGCTTCGGCAGTTTTC
CCTTGCCAACTGACGCTTATATTGTTTCTAGGGGTGTTCTGCTTTCACGGTACTGGTCTTACCTCGTTGGAGGTGTT
CTGTAGGGGAAGGTGTTACTTTGACGACCGGTACACAAATTTCAACAATTTTGGTAATTCGTTGATGATGATGATGCG
CTCACCACTTTGGAGAAGTGGAGCCCGTCGCTTCGGGAAGGTATGAATGTCACACGCAATGCACTGAAGATGATTGCA
GCGTGAACATGGGTGCGGCTTTTACTGTCTTCTGCTACTTGTTCCTCGGGTTAATTGTTCTCAGTTTTTACATGGCG
GTGATTGTGGATCATTACGTTACAGCTGCACGCATGAACACGAGCATAACACGTATTGAAGACCTGCGGAGGTTCCCGT
ATCTGTGGTCCGAGTTCGATCCCAATGGAGCACTCGTGTGCACACACGAACTCCCAAACTTCTCGAATCTCTGAG
ACCACCCCTTGGTCTTACCTCCAGGCATAATCGTGTGAGCTTCTTAGATTACTGCGAGAGTATGACATTCCAAATCACC
GTGGGAAAGTTACTACCACGAGGTGCTTCTGCCGTTGGCTCGCAGGGTCTCGGAATGGCCTTCAGCAGAGATACGA
TGGATTACAGGACAACGTTTACACATTATGGCGCACTCCGAGAAGTCCGCTCCGTCGACTGCCAACAGTGTCTTGGTAA
GCGTCCCACGCAACCGCGCAGCATTTTGTGTCGAGTATGTGCAGGCGGTATGCCGAAGGAAGAAAGCTTGTGTC
GAGAGGTGACAGGGGTACGATCTGAACCTTTGGCAGGAGGTGCTGCTGTTTGTGACGAGCTCGTTTTGCCCTATGCGG
ATTACGGCTTTGGAAACCTTTTACTGGAGGGTCCGGATCCTATGCGAGATCTTGTGCCACGCAGTGCCTCTGCAGCGA
GCTCTGGTGGAAAAGGCACCCGAAAAGGTGCCAGTGAAGCGGAGAACGCCGCTTCTCCCACTGTGGCGGGCAGGC
CAGGCCGAATCCCGTCGAGTCCAAGGAGTGAAGGAGAAACGATTGACGGCAGGGCCCTGCCGCCGCTTCCC
GCGCGTACCAACCGGCGATAGAAGAACGTGAGAAACGTTTGGCCCGATGTTCCGAACGCTTTCGACGCCACGAAA
CACGCTCGGAAAACTTAGACGCAAGGATGAGGAGCGGATGCTGCAATCCACTCCCGATGATGCGGTGTCTTACCAG
TATCCAACGTGCGCTCGAATTCGACGCGAGTTAACGTGGGCGAATACCAGCCACTAGGAACAGATCCCACCAAGT
GGCTTGGTAGCAATGTAACCGTGGGTCAACCGTAGGTGGACCAACGACAGAATCTCGCACGAGTAGCGTTATGCCTG
CTCCACAGGGACCTACAGCACCAGAGTAG

Figura 57. Secuencia nucleotídica de Putativo canal de Ca²⁺ en *T. evansi*. Secuencia consenso para putativo canal de Ca²⁺ en *T. evansi* obtenida a partir de los productos secuenciados. El ensamblaje de la secuencia se realizo en el programa BioLing (Alinment and multiple contig editor 2000-2005)

10	20	30	40	50	60
MAEPPPPQPL	RKGFRRADPH	GLRPPESPRD	AEEPENHDIV	EDPPLPSSRN	LPPPLRLPMG
70	80	90	100	110	120
GGPPLAGAEÄ	AATSHSNNRP	SPGEVPLPR	PGTTTAVTSA	QYNSLTPRQE	LFSSPQTAVE
130	140	150	160	170	180
ENIPAGYDNQ	MNVTSNDFSH	SQDTGIKRIG	DGATGSSAKT	RSTIAHAPSG	RFSEVVQERP
190	200	210	220	230	240
PIESVEQLCQ	LQTLAHPVER	FFVEYQPMAT	RGCRSTQVPV	EEDEALFNHL	AEYTDDEDSFF
250	260	270	280	290	300
SSGSAVLEED	TRRLQNDPLR	GRAIRSVFET	LSLRSLTKGR	IPYELEDQER	SSAPWLKQVH
310	320	330	340	350	360
QRAIALHHSS	FFIFPAGMKA	RVIAYNILHH	WLTEMLLMLI	ILVYSMMTAA	WSRNTWPTLE
370	380	390	400	410	420
KPSFMFFADV	FFLCIYTIEF	VARLFTSGAV	SHSRAYFRSP	WHCLDAVLL	LMILNCTNLQ
430	440	450	460	470	480
SMWNFSAFRL	IRVLKSSTYV	PIPINMKLLA	KSLLRSTSNV	VKVSTILFYV	LLFFSLVGLQ

490	500	510	520	530	540
LFSGVLQHRĀ	VSPTTKNVTK	QVCRFNHSEK	NESYYHGATĀ	PSPHLCVADT	YGNPHHGYRS
550	560	570	580	590	600
FDSVGHFSFLS	AFQIMTFQGW	TSLLOQETSDT	TSVAAILYFF	LAILICAWII	PSLYLGVFIE
610	620	630	640	650	660
KIEKTRRLFV	QKQLQLFDGM	LLEQRQLNE	AIKLRDFVER	DESGKLRRHP	IELIRSASRR
670	680	690	700	710	720
IQRSKLSNSQ	TSIATESESG	EPAVVVKKPI	GDTTKGRSRW	TDEQRVQLHL	SLTRQRDIAS
730	740	750	760	770	780
GGERRRRVVI	KNDGEISGGT	AGLHSQRKGS	ESIGERAMMV	TGDFALGGRV	GVVQHHPLTH
790	800	810	820	830	840
TIGAAHGTDL	PLAVRLDNEE	EQLRFLKDYQ	NPIDNDIMRR	TNTFEDTNGN	LHPSFVLTST
850	860	870	880	890	900
QRRGGSFDEA	SNTIRTTTEA	AGVIPSRHSA	TLNGHNTSRM	DSNGSLDEPT	SKTQTVSKRG
910	920	930	940	950	960
SPMPRLSSGQ	VPEVIIHDPE	GGDFRFAETR	SQKWGIVRNI	LHMFTEGYPR	IITQYIREHR
970	980	990	1000	1010	1020
RMQRRFGLTP	LNYVNKYEDD	VLRKLRQRRV	LQVKEPGAPS	QTSRASGDEE	LVEVNGNKVI
1030	1040	1050	1060	1070	1080
LTDSDDIGDL	SPIQMATNIV	RNVPVTPFGA	VMLVIVIVNG	IFNATRYFQQ	PEYWETALFV
1090	1100	1110	1120	1130	1140
LGIIIFTSFFV	LEIVVRVIGL	GLVSFLLDNF	NLLDVTVTIL	GFVELAYARS	NVVTVLNWVR
1150	1160	1170	1180	1190	1200
LLRLFRTLFP	APMRRVSRVL	LLGFADMLYA	LFFFSIYFMF	WILIGMSFFG	GPNGMVDHTF
1210	1220	1230	1240	1250	1260
QDYIYTRGNFD	TFSGASFAVS	QAFSYTREEW	VYLTWNGMQS	RGEYTVLYFM	AVVGVAFIAR
1270	1280	1290	1300	1310	1320
YFFVAVFAWA	WQSEEEEEEN	YAAIAKGGSG	GRREVTRLRW	FDFTVWRSFK	HIHGGFERRD
1330	1340	1350	1360	1370	1380
VAPDEVFHLN	EDMRKQLRIA	EAKERFTKEA	LAQTDLAMSQ	RRMGSPMASP	SATMGYNTDG
1390	1400	1410	1420	1430	1440
YAPAAQVGTA	PRYVNVGGQL	QRHINPSVDF	VDAQVPPLNA	PISQFQAENA	QLRFARRYST
1450	1460	1470	1480	1490	1500
VPASVYTPVI	QDDGIDRPSP	SARSSPSDAG	ERSGELGGES	QQNGQEEGDG	QYSPRGVSPN
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GTGGRATSTG	LQRKSSVLGR	FPRLGYDRAA	GKKDGGSRSV	SASAMQQTGD	GNELRGDYVN
1570	1580	1590	1600	1610	1620
EGEVNGGSMV	YEHILYPGPR	LRYKHVMRNQ	YVRVFERCLD	CNTYQQMPLR	APPNVQQRTP

1630	1640	1650	1660	1670	1680
EELHAEHCHM	AAVRSSRQLV	LNAIMGYVRL	QKDINQPPTR	DAVETVLGQA	WSCGMLLFET
1690	1700	1710	1720	1730	1740
IEYLSKSDIE	QREYRTWDRT	LEALQLQQWL	IGLHVGEQV	GRATLAYTLA	HRKREKLAVE
1750	1760	1770	1780	1790	1800
HKSFELSWRQ	RSFFFISPSN	PVRLSTRIL	QSRWFDIFIL	TVIFIASFCL	CFHIPGKAND
1810	1820	1830	1840	1850	1860
PETGFVVLRA	FDGIFTCIFL	VEMIMKWISM	GVILFRPEAY	FWHWWNVDFD	VIVIVSLIGL
1870	1880	1890	1900	1910	1920
ADQHSALRSI	KVLRFCRILI	PMRVSNFNRS	LSKISSALLD	CLPTVANILL	LFFINYFVWA
1930	1940	1950	1960	1970	1980
VLAVRLLNGL	THSCSDPSFV	DITACEDAKH	EWLPKVRNFD	SFFQSLTMI	EVSVGSKWLD
1990	2000	2010	2020	2030	2040
VIYTGNGRT	SEHAPMDDHY	LARGFFIVY	YYVSHLILFS	LFTASMIYSY	LLTKNAAEGV
2050	2060	2070	2080	2090	2100
LGITFEHQLW	IRMQRMTLQL	KPRVKLVPLC	NHVSQFLHNV	VIRPIFEVVG	ASVLLLNIIT
2110	2120	2130	2140	2150	2160
MALHWYGETK	SKASVLAAFQ	YVWMFYFTVE	AAMKIGAHGM	RAFSRWAFSF	DDFVLLLSFI
2170	2180	2190	2200	2210	2220
GLIVDAASSE	GMPFNVNVLRL	MLRLGRFFSA	AKVFKPMRKQ	FSLLEHLIR	SAVSLANVTL
2230	2240	2250	2260	2270	2280
ILFLGVFVFT	VLGLHLVGGV	PVGEQGYFDD	RYTNFNNGFN	SLMMTFRLTT	LENWSPSLRE
2290	2300	2310	2320	2330	2340
GMNVTRKCTE	DDCSVNYGSA	FYCLLLLVLFL	GLIVLSFYMA	VIVDHYVTA	RMNTSITRIE
2350	2360	2370	2380	2390	2400
DLRRFRDLWS	EFDPNGALVL	HTHELPKLE	SLRPPLGLTS	RHNRVELLR	LREYDIPNHR
2410	2420	2430	2440	2450	2460
GKVHYHEVLL	PLARRVLAMA	FSRDTMDYRT	TFDTLWRHSE	KSLRALPTVL	GKRSHATAAQ
2470	2480	2490	2500	2510	2520
HFAASYVQAV	CRRKKACREV	QVRSELWHE	GRAVCDELGL	PYADYGFGNL	LLEGDPMRD
2530	2540	2550	2560	2570	2580
LVPRSASAAS	SGGKGTRKGA	SEAENAASSP	LWRAGQAESP	SSPRSEGETI	DGRAPAARLP
2590	2600	2610	2620	2630	2640
GAYQPAIEER	EKRFGPDVFN	ALRRHETRSE	KLRRKDEERM	LQSTPDDAVS	SPVSNVRSNS
2650	2660	2670	2680	2690	
QRVNVGEYQP	PLGTDPTSWL	GSNVNRGSTV	GGPTTESRTS	SVMPAPQGPT	APE

Figura 58.- Secuencia aminoácídica de putativo canal de Ca^{2+} de *Trypanosoma evansi* Secuencia aminoácídica de Putativo canal de Ca^{2+} en *T. evansi*. Programa Compute P/I/Mw" (Gasteiger E. y col., 2005

Caracterización de los dominios funcionales presentes en putativo canal de Ca^{2+} de *Trypanosoma evansi*

Con el propósito de evaluar posibles dominios funcionales sobre la secuencia, utilizamos nuevamente el programa **InterProScan** mostrándose los resultados en la figura 59. En esta figura cabe destacar la presencia de cuatro dominios, identificados por la base de datos PFAM (morado), como dominios de translocación de cationes, los cuales se encuentran entre los aa 368-597, 1022-1258, 1811-2026 y 2119-2322. Esta base de datos, agrupa a las proteínas contentivas de este tipo de dominios en la subfamilia PF00520. Esta subfamilia agrupa a canales de Na^+ de K^+ y Ca^{2+} , las cuales se caracterizan por presentar repeticiones en tándem de seis hélices transmembrana entre las cuales las últimas dos flanquean una región que determina la selectividad del ión a transportar.

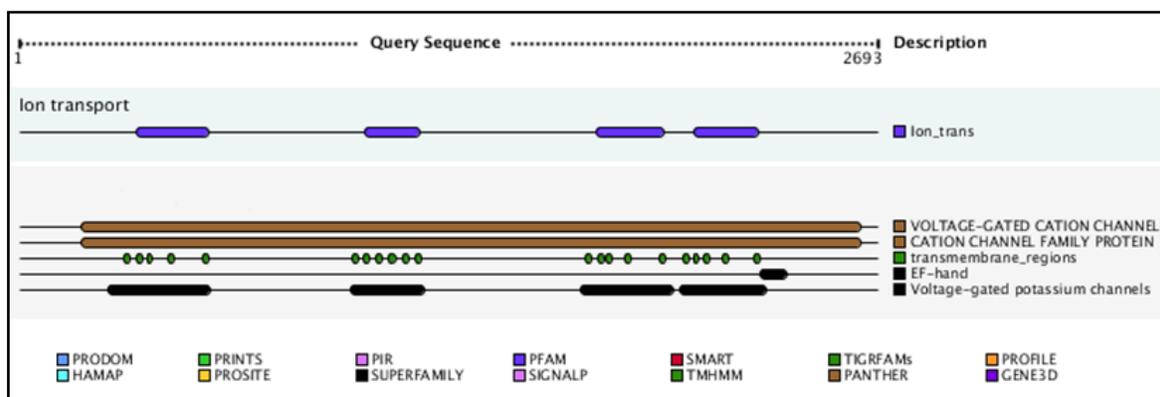


Figura 59. Dominios funcionales presentes en el putativo Canal de Ca^{2+} de *Trypanosoma evansi*. El esquema muestra los principales dominios conservados encontrados en la secuencia del putativo canal de Ca^{2+} de *T. evansi*. Este esquema fue arrojado por el programa InterproScan. Los colores mostrados en el esquema corresponden a las bases de datos donde fue encontrado dicho dominio.

Por otra parte, el programa InterProScan pudo ubicar sobre nuestra secuencia un dominio de unión a Ca^{2+} (EF) entre los aa 2324 y 2409 predicho por la base de datos Superfamily (color negro) y 21 posibles dominios transmembrana predichos por el programa TMHMM los cuales se listan en la tabla 21.

Identificación de los posibles dominios transmembrana presentes en el posible putativo canal de Ca²⁺ de Trypanosoma evansi

Dado a que el programa InterProScan solo pudo reconocer 21 de los 24 dominios M característicos de la subunidad 1 α de canales de calcio, procedimos a determinar la presencia de estos dominios con ayuda del programa **TopPred**. Los dominios con mayor confiabilidad predichos por este programa se muestran en la figura 60 y donde cabe destacar que de los 23 posibles dominios transmembrana predichos por este programa, solo 19 (identificados en la figura) son de alta confiabilidad (valor de Hidrofobicidad igual o superior a 1).

Por otra parte, se corroboraron estos posibles Dominios M con el programa **HMMTOP**. La posición de los dominios M sobre la secuencia obtenida para el putativo canal de Ca²⁺, arrojadas por estos programa se listan en la tabla 21. Los dominios M seleccionados en base al análisis de los resultados de la tabla 21, los cuales se ilustran en el modelos topológico del putativo canal Ca²⁺ (Fig. 61).

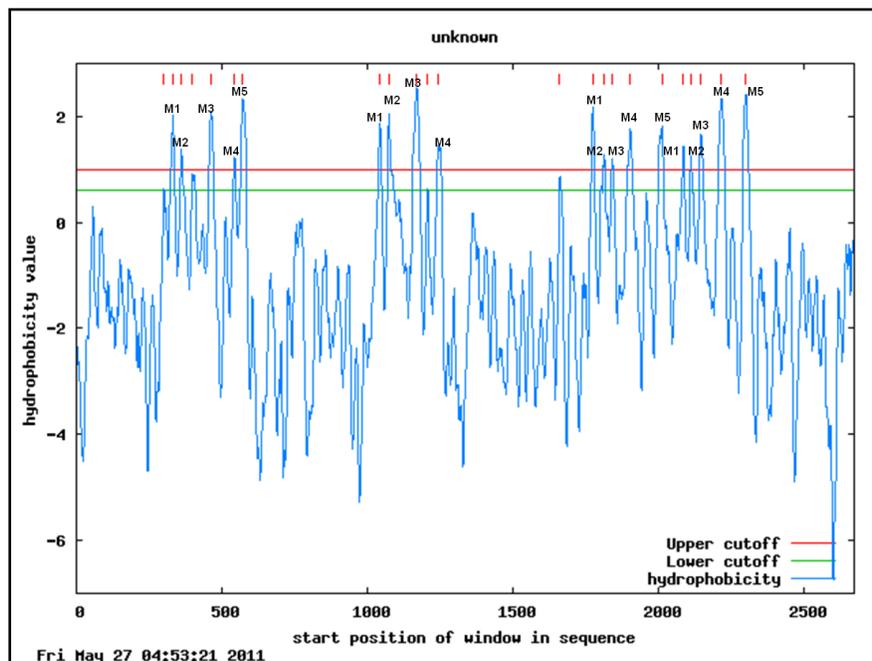


Figura 60. Posibles dominios transmembrana presentes en el putativo canal de Ca²⁺ de Trypanosoma evansi. El esquema muestra los principales dominios Transmembrana encontrados en la secuencia de PMCA de T. evansi. Este esquema fue arrojado por el programa TopPred. Valores superiores a 1 (línea roja) sugieren dominios transmembrana altamente confiables. Valores entre 0.6 y 1 (línea verde) sugieren posibles dominios transmembrana.

Tabla 21. Posibles Dominios transmembrana de putativo Canal de Ca²⁺ de *T.evansi*

Dominios Transmembrana PMCA4b	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (InterProScan)	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (TopPred)	Posibles Dominios Transmembrana <i>T. evansi</i> (HMMTOP)
M1	322-344	300-320	310-328
M2	364-386	332-352	335-352
M3	406-428	362-382	365-389
M4	460-482	399-419	406-428
M5	545-564	463-483	459-476
M6	577-599	544-564	574-598
M7	1043-1065	571-591	1048-1065
M8	1078-1100	1042-1962	1074-1091
M9	1115-1137	1075-1095	1098-1115
M10	1161-1183	1169-1189	1122-1139
M11	1203-1225	1207-1227	1160-1184
M12	1246-1268	1244-1264	1209-1226
M13	1774-1796	1662-1682	1245-1269
M14	1805-1824	1775-1795	1777-1794
M15	1832-1861	1813-1833	1813-1835
M16	1905-1925	1842-1862	1850-1867
M17	2006-2028	1904-1924	1898-1922
M18	2085-2107	2013-2033	2016-2033
M19	2117-2139	2087-2107	2064-2082
M20	2146-2168	2113-2133	2089-2106
M21	2220-2242	2147-2167	2113-2137
M22	2301-2323	2217-2237	2152-2176
M23	-	2300-2320	2207-2231
M24	-	-	2299-2323

Análisis de la presencia de posibles dominios de unión a CaM en el Putativo Canal de Ca²⁺ de *Trypanosoma evansi*

Una vez analizados los posibles dominios transmembrana presentes en esta secuencia, procedimos a la búsqueda de posibles dominios de unión a la CaM. Aunque, el análisis del putativo canal de Ca²⁺ de *T. evansi* por el programa **InterProScan** no predijo la presencia de un dominio convencional de unión a CaM, se procedió a buscar posibles dominios no convencionales de unión a CaM y determinar su ubicación, dado que estos dominios están presentes en las subunidades α de canales de Ca²⁺ descritos en eucariotas superiores (Benoff y col., 2007). Por tal motivo, procedimos nuevamente a utilizar el programa “**Calmodulin target Database**”, cuyo análisis sobre la secuencia del putativo Canal de Ca²⁺ de *T. evansi* arrojó los resultados mostrados en figura 61, en la cual, podemos observar solo la presencia de una región de alta confiabilidad (valores de 9), de 10 residuos aminoacídicos, ubicada entre los aa 1290 al 1300 y ninguna posible región hacia el extremo C-terminal de la enzima donde están reportadas en eucariotas superiores.

.1051	VMLVIVVNG 0000000000	IFNATRYFQQ 0000000000	PEYWETALFV 0000000000	LGIIFTSFFV 0000000000	LEIVVRVIGL 0000000000
.1101	GLVSFLDFN 0000000000	NLLDVTVTIL 0000000000	GFVELAYARS 0000000000	NVVTVLNWVR 0000000000	LLRFLRTLFP 0000000000
.1151	APMRRVSRVL 0000000000	LLGFADMLYA 0000000000	LFFFSIYFMF 0000000000	WILIGMSFFG 0000000000	GPNGMVDHTF 0000000000
.1201	QDYYTRGNFD 0000000000	TFSGASFAVS 0000000000	QAFSYTREEW 0000000000	VYLTWNGMQS 0000000000	RGEYTVLYFM 0000000000
.1251	AVGVVAFIAR 0000000000	YFFVAVFAWA 0000000000	WQSEEEEEEN 0000000011	YAAIAKGGSG 1233455677	GRREVTRLRW 8999999998
.1301	FDFTVWRSFK 7765543321	HIHGGFERRD 1100000000	VAPDEVFHLN 0000000000	EDMRKQLRIA 0000000000	EAKERFTKEA 0000000000
.1351	LAQTDLAMSQ 0000000000	RRMGSPMASP 0000000000	SATMGYNTDG 0000000000	YAPAAQVGTA 0000000000	PRYVNVGGQL 0000000000
.1401	QRHINPSVDF 0000000000	VDAQVPLNA 0000000000	PISQFQAENA 0000000000	QLRFARRYST 0000000000	VPASVYTPVI 0000000000
.1451	QDDGIDRPSP 0000000000	SARSSPSDAG 0000000000	ERSGELGGES 0000000000	QQNGQEEGDG 0000000000	QYSPRGVSPN 0000000000
.1501	GTGGRATSTG 0000000000	LQRKSSVLGR 0000000000	FPRLGYDRAA 1111111111	GKKDGGSRV 1111111111	SASAMQQTGD 0000000000
.1551	GNELRGDYVN 0000000000	EGEVNGGSMV 0000000000	YEHILYPGPR 0000011111	LRYKHVMRNQ 1111111111	YVRVFERCLD 1111110000
.1601	CNTYQQMPLR 0000000000	APPNVQQRTP 0000000000	EELHAEHCHM 0000000001	AAVRSSRQLV 1123333333	LNAIMGYVRL 3333333333

Figura 61. Dominios no convencionales de unión a Calmodulina en el Putativo Canal de Ca²⁺ de *T. evansi*. La figura muestra el análisis de la secuencia del posible Canal Putativo de Ca²⁺ *T. evansi* por el programa “*Calmodulin target Database*”. El programa evalúa la secuencia asignando valores entre 0 y 9, donde 9 representa un posible dominio de unión a CaM.

Análisis de similitud y homología de Putativo Canal de Ca²⁺ de *Trypanosoma evansi*

Una vez demostrada la posibilidad de que la secuencia puede ser un putativo canal de Ca²⁺, procedimos a realizar un BLAST. Para ello, utilizamos nuevamente la base de datos de la NCBI mostrándose los resultados obtenidos en la tabla 22. Esta tabla lista las 10 primeras proteínas con mayor puntaje de similitud y como se puede observar nuestra secuencia se asemeja a una serie de canales de Ca²⁺ descrito en diferentes tripanosomatideos, en rojo se muestran las proteínas con mayor similitud encontradas en *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania major*. Los resultados del BLAST como se muestra en la tabla 23, arrojan un mayor puntaje (5570), con una secuencia de *T. brucei* descrita como un canal de Ca²⁺ (número de acceso NCBI XP 822541.1), secuencia que originalmente utilizamos para el diseño de los oligos usados. Por otra parte, La secuencia obtenida en *T.*

evansi, comparte homología con un posible canal de calcio en *T. cruzi* (2646) y en *Leishmania major* (21014).

Posteriormente, procedimos a realizar un alineamiento entre la secuencia obtenida en *T. evansi* con las sugeridas en el BLAST (resaltadas en rojo en la tabla 22). Las secuencias utilizadas en este alineamiento corresponden a: *T. brucei* (GI: 71746972) *T. cruzi* (GI: 71665459) y *Leishmania major* (GI: 157875495). En esta oportunidad incluimos en el alineamiento la secuencia de la subunidad $\alpha 1A$ de un canal de calcio voltaje dependiente (GI: 2281752).

Tabla 22. Secuencias homologas al Putativo Canal de Ca^{2+} de *Trypanosoma evansi*

Numero De acceso	Descripción	Puntaje máximo	% Query
XP_822541.1	calcium channel protein <i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	5570	100%
CBH15274.1	calcium channel protein, putative <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> DAL972	5550	100%
XP_819699.1	calcium channel protein <i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener	2646	98%
XP_001686138.1	calcium channel protein; ion transporter <i>Leishmania major</i> strain Friedlin	2014	91%
XP_001468437.1	calcium channel protein; ion transporter <i>Leishmania infantum</i>	1989	91%
XP_001564333.1	calcium channel protein <i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	1944	91%
XP_002508803.1	voltage-gated ion channel superfamily Micromonas sp. RCC299	917	48%
NP_001159376.1	cacophony [Apis mellifera] >gb ACV86997.1 cacophony [Apis mellifera]	797	46%
EFN73328.1	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C	836	46%
XP_001604892.1	PREDICTED: similar to CG1522-PD <i>Nasonia vitripennis</i>	823	47%
EFN82075.1	Voltage-dependent calcium channel type A subunit alpha-1 <i>Harpegnathos saltator</i>	766	47%
XP_002940668.1	PREDICTED: voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A-like <i>Xenopus(Silurana) tropicalis</i>	874	51%
XP_001943929.1	PREDICTED: similar to voltage-dependent p/q type calcium channel <i>Acyrtosiphon pisum</i>	810	46%
AAB64179.1	alpha1A-voltage-dependent calcium channel <i>Homo sapiens</i>	993	51%

Tabla 23. Porcentaje de homología entre secuencias alineadas con putativo Canal de Ca²⁺ de *Trypanosoma evansi* (ClustalW2 EBI Bioinformatics)

Seq A	Nombre	Longitud	SeqB	Nombre	Longitud	% de Homología
1	<i>T. evansi</i>	2693	2	<i>T. brucei</i>	2693	99.0
1	<i>T. evansi</i>	2693	3	<i>T. cruzi</i>	2725	51.0
1	<i>T. evansi</i>	2693	4	<i>L. major</i>	2555	42.0
1	<i>T. evansi</i>	2693	5	Sub α-1A	2505	16.0
2	<i>T. brucei</i>	2693	3	<i>T. cruzi</i>	2725	51.0
2	<i>T. brucei</i>	2693	4	<i>L. major</i>	2555	42.0
2	<i>T. brucei</i>	2693	5	Sub α-1A	2505	16.0
3	<i>T. cruzi</i>	2725	4	<i>L. major</i>	2555	48.0
3	<i>T. cruzi</i>	2725	5	Sub α-1A	2505	15.0
4	<i>L. major</i>	2555	5	Sub α-1A	2505	14.0

La figura 62 muestra el alineamiento correspondiente a la tabla 23 y en ella se destacan sobre la secuencia de la subunidad α1A del canal de Ca²⁺ voltaje dependiente de *Homo sapiens* y sobre la secuencia del Putativo Canal de Ca²⁺ de *T. evansi*, los dominios conservados que la caracterizan a este tipo de proteína: como los dominios transportadores de iones (línea continua subunidad α1A y línea discontinua en *T. evansi*), dominios transmembrana (gris oscuro para subunidad α1A y gris claro en *T. evansi*), dominio P (amarillo) donde se destaca en rojo el residuo selectivo del catión y argininas (R) y lisina (K) en rojo las cuales le confieren la carga positiva característica del dominio M4 de cada dominio transportador. Sobre la figura en la secuencia de la subunidad α1A, también se muestran los epitopes que permiten que esta proteína sea reconocida por el anticuerpo comercial H280 (verde).

<i>T. evansi</i>	MAEPPPPQPLRKGFFRADPHGLRPPESPRDAEENHDIVE--DPPLPSSRNLPPLRRLRP	58
<i>T. brucei</i>	MAEPPPPQPLRKGFFRADPHGLRPPESPRDAEENHDIVE--DPPLPSSRNLPPLRRLRP	58
Trypanosoma	MSGVPPAYPVDSNIGVNPNAHTQQRLPASGSQSNTSSRVIIGGVAPPTSTGRPHLPLPLPP	60
Leishmania	-----	
<i>Homo sapiens</i>	-----	
<i>T. evansi</i>	MGGGPPLAGAEAAAATSHSNRNPSPGVEVPLP-RPGTTTAVTSAQYNSLTPRQELFSSPQT	117
<i>T. brucei</i>	MGGGPPLAGAEAAAATSHSNRNPSPGVEVPLP-RPGTTTAVTSAQYNSLTPRQELFSSPQT	117
Trypanosoma	VKGAASQPPLTGTGSVPAPGHPPMGRLTPLQHRTLDTGTEAQPGRPSPPLRPMNSSTTQ	120
Leishmania	-----	
<i>Homo sapiens</i>	-----	
<i>T. evansi</i>	AVEEN-----IPAGYDNQNMVTSNDFS-----HSQDTGIKIRIGDGATGSS	157
<i>T. brucei</i>	AVEEN-----IPAGYDNQNMVTSNDFS-----HSQDTGIKIRIGDGATGSS	157
Trypanosoma	PTEASGAAENGDGQSSAAGGLPTFHATINPLSPISQQEQLRQQRQHTPSRKTTDRAGTSS	180
Leishmania	-----	
<i>Homo sapiens</i>	-----	
<i>T. evansi</i>	AKTRSTIAHAPSGRFSEVVQERPPIESVEQLCQLQTLAHPVERFFVEYQPMATRGRCRSTQ	217
<i>T. brucei</i>	AKTRSTIAHAPSGRFSEVVQERPPIESVEQLCQLQTLAHPVERFFVEYQPMATRGRCRSTQ	217
Trypanosoma	ARSRKTMTPASQ-QGTRPQSAISGEETVEVLCPLPTQTRPVERFFVEFNPGAIVGNRDD	239
Leishmania	-----MEIP-----LARTQPIEKFFVEYNSAAAER-EDDG	29
<i>Homo sapiens</i>	-----	
<i>T. evansi</i>	VPVEEDEALFNHLAEYTDSDSFFSSGSAVLEEDTRRLQNDPLRGRAIRSVFETLSLRSLT	277
<i>T. brucei</i>	VPVEEDEALFNHLAEYTDSDSFFSSGSAVLEEDTRRLQNDPLRGRAIRSVFETLSLRSLT	277
Trypanosoma	NAMYEEALLFDRLAEYTEDSDSFFSSGSSVLEEDPRRLQKDFRERAVRSVYDITLNLRALT	299

T. evansi RDFVERDESGKLRRHPIELIRSASRRIQRSKLSNSQTSIATES-----ESGEPAVVVKKP 689
T. brucei RDFVERDESGKLRRHPIELIRSASRRIQRSKLSNSQTSIATES-----ESGEPAVVVKKP 689
 Trypanosoma RDFVERDECGRLRGLHAEAPEDTSYPTLRVNSASSNGKFPESGFSNRSNRSNTSVVTG 715
 Leishmania NDYVERDENG FVSHYPAYTLQQDDKRLTSDDTASGS-----ADDKNMNAHRIK 496
 Homo sapiens ISKAEVILAEDETDGEQRHFPD GALRRRTIKKSKTDLLNPEEAEDQLADIASVSGSPFAR 455
 . . *

T. evansi IGDTTKGRSRWTDQQRVQLHLSLTRQORDIASGGERRR-----RVVIKNDGE----- 735
T. brucei IGDTTKGRSRWTDQQRVQLHLSLTRQORDIASGGERRR-----RVVIKNDGE----- 735
 Trypanosoma SSGAAKKRTKWTDEQQRVQLHLSLTRQORDIAEQGERRR-----RVIFKVDKK----- 761
 Leishmania SHHRAIQATKWTDEQRIQLQLALTRQRHVAAEEAERKRQLQQTALGD LIVEEGGAGKRQGT 556
 Homo sapiens ASIKSAKLENSTFFHKKERMRMFYIRRMVKTQAFYWTVLSLVALNTLCVAIVHYN----- 510
 : . * : : : : : * : . .

M1B

T. evansi --ISGGTAGLHSQRKGSSEIGERAMMVTGDFALGGR-VGVVQHHPHTHTIGAAHGTDLPL 792
T. brucei --ISGGTAGLHSQRKGSSEIGERAMMVTGDFALGGR-VGVVQHHPHTHTIGAAHGTDLPL 792
 Trypanosoma --ETDHTNGNFEMS--SVSTNTTNNMGGDFALGGR-VGTVQHHPHTHTIGAAHGTDLPL 816
 Leishmania VRQACPAGAASGWATQTEASPHSTKERSDFALGGR-VGAVQHHPAAYAIGDSHQSDLPL 615
 Homo sapiens --QPEWLSDFLYYAEFFIFLGLFMSEMFIKMYGLGTRPYFHSSFNCFDCGVIIGSIFEVW 568
 . : . * * . . : . .

M2B

M3B

T. evansi AVRLDNEEQRLRFLKDYQNPIDNDIMRRTN-----TFEDTN-----GNLHPSFVLT 838
T. brucei AVRLDNEEQRLRFLKDYQNPIDNDIMRRTN-----TFEDTN-----GNLHPSFVLT 838
 Trypanosoma AVRLNEQERLQFLKYYQQAEEADDTLQGGLTRGSRGVDGSTN-----NNMNSHLSH 870
 Leishmania AVRQEVQAEQLRFLDPYTNASTAKNDMYNAAAAALHTSMDKSRAAVPGGGAESATVLH 675
 Homo sapiens AVIKPGTSGFISVLRALRLRIFKVIKYYWASLRNLVVSLLNSMKSIIISLLFLFLFIVVE 628
 ** : . *

M4B

M5B

Sensor de Voltaje +

T. evansi S---TQRRG--GSFDEASNTIRTTTEAAGVIPSRRHSATLNGHNTSRMDSNGSLDEPTS-- 891
T. brucei S---TQRRG--GSFDEASNTIRTTTEAAGVIPSRRHSATLNGHNTSRMDSNGSLDEPTS-- 891
 Trypanosoma S---HPMRRGVGHGDMGSDIITIREAGVIPNRRSATTRGN-----TSGASTLRSTS-- 920
 Leishmania SRPASNARPSTRAPSAPSTSVMVAREAGVPPHRRSMSVRRG---TLRASSMNGRSS-- 730
 Homo sapiens ALLGMQLFGGFQNFDEGTPPTNFDTFPAAMTVFQILTCFDWNEVMYDGIKSQGGVQGGM 688
 : *

Región P

T. evansi KTQTVSKRGSMPRLSSGQVPEVI IHDPEGGDFRFAETRSQKWGIVRNILHMFTEGYPRI 951
T. brucei KTQTVSKRGSMPRLSSGQVPEVI IHDPEGGDFRFAETRSQKWGIVRNILHMFTEGYPRI 951
 Trypanosoma TAAAAALNGSAG---GVAQSQEIL IHDPEGGDFRYAKTFQSWGII RNILHMFTEGCPRI 977
 Leishmania LSRLHASMTQVQQAPTQQEQYAYVINDPEGGDFDYAKTLGQKIDIRNI AHMFTEGYPRI 790
 Homo sapiens VFSIYFIVLTLFGNYTLNVLFLAIAVDNLANAQELTKDEQEEEEANQKALQKAKEVAE 748
 : : * . . : : . . : . .

M6B

T. evansi ITQYIREHRRMQRRFGLTPLNYVNKYEDDVLRLKLRQRRVLQVKEPGAPSQTS-----RA 1005
T. brucei ITQYIREHRRMQRRFGLTPLNYVNKYEDDVLRLKLRQRRVLQVKEPGAPSQTS-----RA 1005
 Trypanosoma LTQYLWEHRRMQTRFGLLPLNYVNKYEEAALRKLRLQKRARRGK---LILKNN-----RI 1028
 Leishmania ISQYLWEHRRMQHRYGLTPLSYTNKYEEAALRRLRQRRAQERREEREELRRSGMGLIDD 850
 Homo sapiens VSPLSAANMSIAVKEQQKNQKPAKSVWEQRTSEMRKQNLASREALYNEMDPD-----ER 803
 : : : : . . . : : * : : .

M2B

T. evansi SGDEELVEVNGNKVILTDSDDIGDLSPIQMATNIVRNVPTVFPFVAVMLVIVVINGIFNAT 1065
T. brucei SGDEELVEVNGNKVILTDSDDIGDLSPIQMATNIVRNVPTVFPFVAVMLVIVVINGIFNAT 1065
 Trypanosoma EDDGTDDYSEPEEPANEDQEYLGKLSPIRMAKNIVENAPVTLFSGIMLFLVFANGVFNAS 1088
 Leishmania DDDDDDDVAEKPMRQEGLVPGMSPIRMARNIRENAPITVFNYIMYSFIIANAVFNAS 910
 Homo sapiens WKAAAYTRHLRDPDMKTHLDRPLVVDQENRNNNTNKSRAAEPTVDQRLGQQRAEDFLRKQA 863
 . : : : : : : .

	M3B	M4B	
<i>T. evansi</i>	RYFQQPEYWE TALFVLGIIFTSFFVLEIVVR VIGLGLVSFL DFNNLLDVTVTILGFVEL		1125
<i>T. brucei</i>	RYFQQPEYWE TALFVLGIIFTSFFVLEIVVR VIGLGLVSFL DFNNLLDVTVTILGFVEL		1125
Trypanosoma	RHYGQPVYEDGLFIAGVCFTSLFMLELIIRFIVLGPFPVCFDFINVICVIVTVIGFFEL		1148
Leishmania	RFDTMPDYWETGTFIAGVCFSVLFMLELLIRLLALGPGPFDTDLILIEATFMVTSLFLQ		970
Homo sapiens	RYHDRARDPSGSAGLDARRPWAGSQEAELSREGPYGRESDDHAREGSLEQPGFWEGEAER		923
	* : . : * * . . : . : . .		

	Sensor de Voltaje +	M5B	
<i>T. evansi</i>	AYA S SNVVTVLNWV LLSLEF TLPFAPMRRVSRVLLLG FADMLYALFFFSIYMFMWILIG		1185
<i>T. brucei</i>	AYARSNVVTVLNWVRLRLR LFRTLPFAPMRRVSRVLLLG FADMLYALFFFSIYMFMWILIG		1185
Trypanosoma	FGHSENTITVLNWVRFRLRFRIAPFAPMRRVTRVLLGFQDIVYALILFSVYMFMWILIG		1208
Leishmania	GYSRNTTSLFNWVRFRLRFVPCRPLRVRVLIHGFPDMVYALVLFVLYMFMWLLLG		1030
Homo sapiens	GKAGDPHRRHVHRQGSRESRSGSPRTGADGEHRRHRAHRRPGEEGPEDKAERRARHREG		983
 : * * . . : *		

	Posible Region P	
<i>T. evansi</i>	MSFFGGPNGMVDHTFQDYTRGNFDTFSGASFAVSQA F SY TR EW VYLTWNGMQSRGEYT	1245
<i>T. brucei</i>	MSFFGGPNGMVDHTFQDYTRGNFDTFSGASFAVSQA F SY TR EW VYLTWNGMQSRGEYT	1245
Trypanosoma	MSFFGGRFGRLLTQNDYATIGFDFTFSHATFAVAQA F SYVRDEWLYLSWDGMVRGGYT	1268
Leishmania	MSFFGSRIGWIDYNTSDYTRGTFFETFSHAAYAVAQA F SVNRDQWLYLSWSGMRVRRGGYT	1090
Homo sapiens	SRPARGGEGEGPDGGERRRRHGAPATYEGDARREDKERRHRRRKENQGSVVPVSGP	1043
	. * : . . : * . . *	

	M6B	
<i>T. evansi</i>	VLY FMAVVGVAFIARYFFVAVFAWA WQSEEEEEENYAAIAKGGSGRRVTRLRWFDFTV	1305
<i>T. brucei</i>	VLY FMAVVGVAFIARYFFVAVFAWA WQSEEEEEENYAAIAKGGSGRRVTRLRWFDFTV	1305
Trypanosoma	IIYFLAVVFVAFIFRYLFIAVFAWA WQQEEREDYVLH TSKGGHQNRGGPRLHWFDFTV	1328
Leishmania	VLYFIATVCVAFVFRFFFIAMTYAWQA Q QEKEDYFMSGSSHGRRSR-FARLFFDFSV	1149
Homo sapiens	NLSTTRPIQQDLGRQDPLAEDIDNMKNKLATAESAAPHGSLGHAGLPQSPAKMGNSTD	1103
	: : : : : * : : : . . : : :	

<i>T. evansi</i>	WRSFKHIHGGFERRDVAPDEVFHLNEDMRKQLRIAEAKERFTKEALAQTDLAMSQRMG	1365
<i>T. brucei</i>	WRSFKHIHGGFERRDVAPDEVFHLNEDMRKQLRIAEAKERFTKEALAQTDLAMSQRMG	1365
Trypanosoma	WRSFKHIHGGFERRDVAPDEVFHLNEDMRKQLRIAEAKERFTRESMTRRGRFSADPQTIFS	1388
Leishmania	WRSFKHIHGGFERRDVAPDEIYFLNEDMARQLRLVEAKDRYRENYGQERSEWGDIGEGS	1209
Homo sapiens	PGPMLAIPAMATNPQNAASRRTPNNPNSNPNGPKTPENSLIVTNPSTQNSAKTARK	1163
	. : * . . : * . . . * . . : : : . . .	

<i>T. evansi</i>	PMASPSATMG-YNTDGYAPAAQVGTAPRYVNVGGQLQRHINPSVDFVDAQVPPNAPISQ	1424
<i>T. brucei</i>	PMASPSATMG-YNTDGYAPAAQVGTAPRYVNVGGQLQRHINPSVDFVDAQVPPNAPISQ	1424
Trypanosoma	DSFSTNGNVASYGMPSSAPPLML--APQFVNVGGQLQRQMSMPSTFDEPPHPAQAPISR	1446
Leishmania	QMGDS-----DVYRSDGALVNGPQYVNIIGGRLYRQPSLPATEMG-----FSVGG	1253
Homo sapiens	PDHTTVDIPPACPPPLNHTVVQVKNANPDPLPKKEEKKEEEDDRGEDGPKMPYPYS	1223
 : . . : :	

<i>T. evansi</i>	FQAENAQLRFARRYSTVPASVYTPVIQD--DGIDRPSPSARSSPSDAGERSGEL-GGESQ	1481
<i>T. brucei</i>	FQAENAQLRFARRYSTVPASVYTPVIQD--DGIDRPSPSARSSPSDAGERSGEL-GGESQ	1481
Trypanosoma	FQAENAQLRFARRYSAPVATPYRGAEE--LNGAHFLP-VTSTPSDQALHNSNG-SVADT	1502
Leishmania	TPQHRGQLRFARHYRAVPATTYAAAQQQLAGAHADALPDEVEGSRSLSRHSRRS-MVNPL	1312
Homo sapiens	MFILSTTNPLRRLCHYILNL RYFEMCILMVIAMSSIALA AEDPQVQPNAPRNVL RYFDYV	1283
	: * : * :	

	M1C	
<i>T. evansi</i>	QNGQEEGDGQYSPRGVSPNGTGGRATSTGLQRKSSVLGRFPRLGYDRAAGKKGDSRSVS	1541
<i>T. brucei</i>	QNGQEEGDGQYSPRGVSPNGTGGRATSTGLQRKSSVLGRFPRLGYDRAAGKKGDSRSVS	1541
Trypanosoma	AAETEGLSHQIGGRASGLYGVHG--SSNLPNEHSSVVTGYFTTLGYDKSGEKKNGEAMENY	1561
Leishmania	LADRHSLSPAHQGTSVGGPSVARVSDSLAEERAKNAN----IGLVPRLTKLGNAARAVVA	1367
Homo sapiens	FTGVFTFEMVIKMI DLGLVLHQGAY F RDLWNILD FIVVSGALVA E AFTGNSKGDINTIK	1343
 : . . :	

M2C

M3C

<i>T. evansi</i>	ASAMQQTGDGNELRGDYVNEGEVNGGS--MVYEHILYPGPRRLRYKHVMRNQYVRFERCL	1599
<i>T. brucei</i>	ASAMQQTGDGNELRGDYVNEGEVNGGS--MVYEHILYPGPRRLRYKHVMRNQYVRFERCL	1599
Trypanosoma	QQSSENEENG-DPENSVDGGGGGGSGGVVYEHVLLPGPRRLRYKHIMVGRHRRVFERCL	1620
Leishmania	GDNDEATADYSTPEGGVSDDED-----LEHLLLPGPRRLRYKSTMD-EGRRVFETCL	1416
Homo sapiens	SLRVLRLRPLKTIKRLPKLKAVDFCVVNSLKNVFNILIVYMLFMFIFAVVAVQLFKGKF	1403

M4C
Sensor de Voltaje +

M5C

<i>T. evansi</i>	DCNTYQQMPLRAPPN--VQQRTPPEELHAEHCHMAAVRSSRQLVNLAIMGYVRLQKDINQP	1657
<i>T. brucei</i>	DCNTYQQMPLRAPPN--VQQRTPPEELHAEHCHMAAVRSSRQLVNLAIMGYVRLQKDINQP	1657
Trypanosoma	DCNVHKQIPLRAPPN--VQQRTADELHAEHCHMAAVRSSRQLVNLNTIIGYVRLQKELGGP	1678
Leishmania	DCNTHMQMPLRAPPG--VAQRTADELHAEHCHMAAVRSSRQLVNLALIGYARMQADHDVT	1474
Homo sapiens	FHCTDESKEFEKDCRGGKYLLEYKNEVKARDREWKYEFHYDNVWALLTLFTVSTCEGWP	1463

Región P

M1C

<i>T. evansi</i>	PTRDAVETVLGQAWSCGMLLFETIEYLSLSCSDIEQREYRTWDRTEALQLQQWLIGLHVGE	1717
<i>T. brucei</i>	PTRDAVETVLGQAWSCGMLLFETIEYLSLSCSDIEQREYRTWDRTEALQLQQWLIGLHVGE	1717
Trypanosoma	PTREAVETVLGQAWSCGMLLFESIEYLSLSCADIELREYRTWDRTEALQLQQWLIGLHLGE	1738
Leishmania	PTKRMVEVVLGQAWSCGMLLFDTIENLSCMDLPEQE-RTWDRMLEALEMQQWLLGLHVGE	1533
Homo sapiens	QVLKHSVDAT-----FENQGFSPGYRMEMSIFYVVYFVVFPFFVFVNIFVALIIIT	1513

M6C

<i>T. evansi</i>	EQVGRATLAYTLAHRKREKLAVEHKSFELSWRQRSFFFISPSNPVRLSTRIIQSRWFDI	1777
<i>T. brucei</i>	EQVGRATLAYTLAHRKREKLAVEHKSFELSWRQRSFFFISPSNPVRLSTRIIQSRWFDI	1777
Trypanosoma	EQVGRATLAYILAHQKTQERVATHSSFHRSWRDRSFFIFSPSHPARFLTAIVESKWFWE	1798
Leishmania	EQVGRATLAYILANQQRQEAQVREKSYKNTWEDRVFVLSPSNPVRRVVSAVVGSMMWFEE	1593
Homo sapiens	FQEQGDKMMEEYSLEKNERACID---FAISAKPLTRHMPQNKQSFQYRMWQFVVSPPFEY	1570

M2C

M3C

<i>T. evansi</i>	FILTVIFIASFCLCFHIPGKAND-----PETGFVVLRAFDGIFTCIFLVEIMIMKWISMG	1831
<i>T. brucei</i>	FILTVIFIASFCLCFHIPGKAND-----PETGFVVLRAFDGIFTCIFLVEIMIMKWISMG	1831
Trypanosoma	FILAVIFAASICLFCFYSPEDEDR-----TSKKYLALHILDDIFAIIFAVEMVLKWISMG	1852
Leishmania	AVLCVVYAASIFLAVYAPDEGNRDFGGSYNSAKYKALHILDDIFSIIFAVEMLLKWISMG	1653
Homo sapiens	TIMAMIALNTIVLMMKFYGASVA-----YENALRVFNIVFTSLFSLCCLVLMVMAFG	1621

M1D

M2D

M4C

<i>T. evansi</i>	VILFRPEAYFHHWVDFVIVIVSLIGLADQHS--ALRSIKVLRRCFRILIPMRVSNFN-	1888
<i>T. brucei</i>	VILFRPEAYFHHWVDFVIVIVSLIGLADQHS--ALRSIKVLRRCFRILIPMRVSNFN-	1888
Trypanosoma	VVLDCHVAYFHRWNTFDCFITIISLIAIAPKYS--HFRFLKVMRCFRILGPMRYCRFN-	1909
Leishmania	VVLPVGRAYFHRWNIFFDFIVIIISLVWGKPDII--FLRYLKVMRCFRILGPLYWYKWS	1711
Homo sapiens	ILN----YFRDAWNIFDFVTVLGSITDILVTEFGNFINLSFLRLFRARLIQLLRQG-	1675

M3D

M4D
Sensor de Voltaje +

M5C

<i>T. evansi</i>	RSLSKISSALLDCLPTVANILLFFINYPVWAVLAVRLLNGLTHSCSDPSFVDITACEDA	1948
<i>T. brucei</i>	RSLSKISSALLDCLPTVANILLFFINYPVWAVLAVRLLNGLTHSCSDPSFVDITACEDA	1948
Trypanosoma	KELSKLALTMWDSVPTLVNVLFLNYIVWSILALRFLMGLTHSCTSHAFSNKTSCEEA	1969
Leishmania	SSMSHVARTIWDSIPTLANVCLMLMNYIVWAIIFVSLFMDKFNYSNASIVNGTQCVEE	1771
Homo sapiens	YTIRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMFFIYAIICMQVFG-----NIGIDVEDEDSDE	1728

M5D

Posible
Región P

<i>T. evansi</i>	KHEWLPKVRNFDSPFQSLTMTIEVSVGSKWLDVIYTGvNGRTSEHAP----MDDHYLARG	2004
<i>T. brucei</i>	KHEWLPKVRNFDSPFQSLTMTIEVSVGSKWLDVIYTGvNGRTSEHAP----MDDHYLARG	2004
Trypanosoma	GAMWLGPRNFDNFYESSLLTMFEVSTGSRWLDVIYTGVDGWSMEFEP----IYNRHPSKG	2025
Leishmania	GYTWAPTQRNFRNFYESSLLTTFEISTGAEWIDVIYSAVDSRSALLSP----LRNQRPYLG	1827
Homo sapiens	DEFQITEHNNFRFTFFQALMLLFRSATGFAWHNIMLSCLSGKPCDKNSGLLTRECNEFAF	1788

Región P

M6C

<i>T. evansi</i>	FFFIVYYYYVSHLILFSLFTASMIY--SYLLTKNAEAGVLGITFEHQWLRMQRMQLQKP	2062
<i>T. brucei</i>	FFFIVYYYYVSHLILFSLFTASMIY--SYLLTKNAEAGVLGITFEHQWLRMQRMQLQKP	2062
Trypanosoma	FFFIVYYYYVSHFVLFSLFVSLIY--CYLLAKNAEAGVDTITFEHQWLRMQRMILRLRP	2083
Leishmania	LVFIAAYYYVSHFIFFTLFISAVIY--CYMLAKSATEDATGTTIEHQVWLRMQGMIFRLKP	1885
Homo sapiens	FYFVSVFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNFEYLTRDSSILGPHHLDEYVVRVWAEYDPAACGRIH	1848

M6D

**Dominio
Unión a Ca²⁺**

<i>T. evansi</i>	RVKLVPLCNHVSQFLHNVVIRPIFEVVGASVLLNLTALHWHYGETKSKASVLAAFQYV	2122
<i>T. brucei</i>	RVKLVPLCNHVSQFLHNVVIRPIFEVVGASVLLNLTALHWHYGETKSKASVLAAFQYV	2122
Trypanosoma	RVELVPLGNCLSRFLHRIVHPAFELVMAGILLCNMIMTSLYWYGNSSRQEKALDILEHL	2143
Leishmania	KVQLLPLNTRVSRVLVHFLISNRWFEAFMGLILVFNMLTMSLEWYQMSSTQKTTLDFAFYI	1945
Homo sapiens	YKDMYSLLRVISPPLG-LGKKCPHRVACKRLLRMDLPVADDNTVHFNSTLMALIRTALDI	1907

M3D

<i>T. evansi</i>	WMFYFTVEAAMKIGAHGMRAFSRWAFSDFDFVLLLSFIGLIVDAASSEGMFPFNVLML	2182
<i>T. brucei</i>	WMFYFTVEAAMKIGAHGMRAFSRWAFSDFDFVLLLSFIGLIVDAASSEGMFPFNVLRLM	2182
Trypanosoma	WVAFFTLEILMKLTAHGLRAFSRYSFCFQVFTSLSYLQIGLNTTVGNHVPFNVTLRLL	2203
Leishmania	WVVIPTLEVVLRVFAHGLRFFTRAYCWDLLIVVLSYIQIGLSTATNHPFNVNVLRLM	2005
Homo sapiens	KIAKGGADKQMDAELRKEMMAIWPNSQKTLDDLVTPHKSTDLTVG-KIYAAMIMEYY	1966

M4D

<i>T. evansi</i>	RLGRFFSAAKVFPMKQFSLLEHVLIRSAVSLANVTLLIFLGVFVFTVLGLHLVGG---	2239
<i>T. brucei</i>	RLGRFFSAAKVFPMKQFSLLEHVLIRSAVSLANVTLLIFLGVFVFTVLGLHLVGG---	2239
Trypanosoma	HLGRMLKLVDFLVPVRHLLHLLHEALLSASSLVNVTLLALAVFVAVLGMHFVIGP---	2260
Leishmania	RVGRVLHLVHLALPFSHTLTFHEVLKASVPGGLISVTFVYMIAYVYFAILGLHFLGY---	2062
Homo sapiens	RQSKAKKLQAMREEQDRTPLMFQRMPPSPTEGEGPGQNALPSTQLDPPGALMAHESGLK	2026

**Posible
Región P**

<i>T. evansi</i>	-VPVGEAGYFDDRYTNFNFGNSLMMTFRLTTLNWNWSPSLREGMNVTRKCT--EDDCSVN	2296
<i>T. brucei</i>	-VPVGEAGYFDDRYTNFNFGNSLMMTFRLTTLNWNWSPSLREGMNVTRKCT--EDDCSVN	2296
Trypanosoma	-VVPVAGQYIDDTYNNFRTPFNALMMIFRLATLEDWVSMRSMDSGNCP--ISDCKTT	2317
Leishmania	-IVPFGS-YIDDKYNNFGTFVNALIMVFRSLTLQNWATMLRGSLDGRGYCTRASKRCGPT	2120
Homo sapiens	ESPSWVTQRAQEMFQKTGTWSPEQGPPTDMPNSQPNSSQVEMREMGRDGYSDSEHYLPME	2086

M5D

<i>T. evansi</i>	YGSIFYCLLLLVLGLIVLSFYMAVIVDHYVTAARMNTSITRIEDLRRFRDLWSEF--DP	2354
<i>T. brucei</i>	YGSIFYCLLLLVLGLIVLSFYMAVIVDHYVTAARMNTSITRIEDLRRFRDLWSEF--DP	2354
Trypanosoma	NWAPVYVYPIVICFALMIVNLYLAVVVDHYVTVVRMKASVARINDLRRFRDLWSAR--DP	2375
Leishmania	DWAPVYIPIVICFALLSTLYMAVVDKYVTAVRIYSVAVTRLDLRRFRDLWSTR--DP	2178
Homo sapiens	GQGRAASMPRLPAENQRRRGRPRGNLSTISDTPMKRSASVLGPKARRLDDYSLEVRPP	2146

Dominio EF

M6D

<i>T. evansi</i>	NGALVLHTHELPKLLSLRPPGLTSRHNRVELLRLLREYDIPNHRGKVHYHEVLLPLAR	2414
<i>T. brucei</i>	NGALVLHTHELPKLLSLRPPGLTSRHNRVELLRLLREYDIPNHRGKVHYHEVLLPLAR	2414
Trypanosoma	NATLLLRTRKRLPELLEALRPPGLSSRKNRAELLRLLREYDIPDHGGKVHYEYVLLPLAR	2435

Leishmania	NGTMWLPSAVLPELEELRPLGLVSDRRNRVEVMQLLREYNI PDHNGRVYYYEVLLPLAR	2238
Homo sapiens	EENQRHHQRRDRSHRASERSLGRYTDVDTGLGTDLSTQSGDLPSKERDQERGRPKDR	2206
:	: . . . ** : * : : . : * * *	
<i>T. evansi</i>	RVLAMAFSR ----DTMDYRTTFDTLWRHSEKSLRALPTVLG--KRSHATAAQHFAASYVQ	2468
<i>T. brucei</i>	RVLAMAFSR----DTMDYRTTFDTLWRHSEKSLRALPTVLG--KRSHATAAQHFAASYVQ	2468
Trypanosoma	RVLAMAFSE----DEIDDGVKFEAVWRLSESSLRALPTVLV--HHSSATAAQHFAASYVQ	2489
Leishmania	RVMAIAFLE TADAHTAGSQAPRDVAWYLSERSLGALPASVYGTVPQSGVTVAEHYAALLQ	2298
Homo sapiens	KHRQHSHHHHHHHPPPPDKDRYAQERPDHGRARARDQRWS---RSPSEGREHMAHRQGS	2263
:	: * * : * * .	
<i>T. evansi</i>	AVCRKKKACREVQVRSELWHEGRAVCDELGLPYADYGFGNLLLEGDPMDRDLVPRSASA	2528
<i>T. brucei</i>	AVCRKKKACREVQVRSELWHEGRAVCDELGLPYADYGFGNLLLEGDPMDRDLVPRSASA	2528
Trypanosoma	AAAYRRDKACRKLHEMRANCWREARRICDELGLPYKDYGFQDVSLLEDPRNEAARRGLLN	2549
Leishmania	AAFRRDRAMRNYIAKSELWRRGRAVCAERGLPYDNFQFGKTPLAGPDPREEGMRGFDI	2358
Homo sapiens	SSVSGSPAPSTSGTSTPRRGRRLPQTPSTPRPHVSYSPVIRKAGGSGPPQQQQQQQQQQ	2323
:	: . * * : . : . . * . : :	
<i>T. evansi</i>	ASSGGKGRKGGASEAENAASSPLWRAGQAESPSSPRSEGETIDGRAPAARLPGAYQPAIE	2588
<i>T. brucei</i>	ASSGGKGRKGGASEAENAASSPLWRAGQAESPSSPRSEGETIDGRAPAARLPGAYQPAIE	2588
Trypanosoma	ESTNEEKQKNAADVT--AAAFAAAGRSESMTTDSNE--SSGKPAPAARLPGLYQPAID	2605
Leishmania	PKDATLANAAGGRIYLDPAARIAAMREAMGSQLRTTD-----QEPPTLLPAVYRSATY	2412
Homo sapiens	QAVARPGRAATSGPRRYPGPTAEPLAGDRPPTGGHSSGRSPRMERRVPGPARSEPRACR	2383
:	: *	
<i>T. evansi</i>	EREKRFGPDVFNALRRHETRSEKLRK--DEER--MLQSTPDDAVSSPVSINVRNSQRVN	2644
<i>T. brucei</i>	EREKRFGPDVFNALRRHETRSEKLRK--DEER--MLQSTPDDAVSSPVSINVRNSQRVN	2644
Trypanosoma	EKEKRFGPDVPHAVRRHETRSDKLRK--EEERQQQQQDPMDRQPSVPPAPRSTAQRNQ	2663
Leishmania	PEEKRFGNAPGAI RRHERRDEKLERKRVQEEYERQMYERSTRSCPARAAGEHKDNETVT	2472
Homo sapiens	HGGARWPASGPHVSEGGPPGRHHGYRGSYDEADGPGSGGEEAMAGAYDAPPVVRHAS	2443
:	: * : . . * : : : : . : . .	
<i>T. evansi</i>	VG-----EYQPPLGTDPTS WLGSNVNRGSTV	2670
<i>T. brucei</i>	VG-----EYQPPLGTDPTS WLGSNVNRGSTV	2670
Trypanosoma	SI-----DYQPPLGTDPSEWLQNMGRMSG	2689
Leishmania	AESAGDVDAGLAYSRGTMEPHAAARGNQYNLDPMDVNYQPPLGTSPEELRQEKVDRR--L	2530
Homo sapiens	SG-----ATGRSPRTPRASGFACASFSRHGRRLPN	2473
:	: . : * . : * . . . *	
<i>T. evansi</i>	GGPTTESRTSSVMP----APQGPTAPE-----	2693
<i>T. brucei</i>	GGPTTESRTSSVMP----APQGPTAPE-----	2693
Trypanosoma	AGAGTLSSANHTGAGGGASPTKATAPPSSEGLDGNV	2725
Leishmania	NAAATAATVSATLG----GISPSTTPEQY-----	2555
Homo sapiens	GYYPAHGLARPRGPGSRKGLHEPYSESDDDWC----	2500

Figura 62. Alineamiento de putativo canal de Ca²⁺ en *Trypanosoma evansi* con canales putativos de Ca²⁺ reportados en otros tripanosomatídios y humanos. Alineamiento realizado con el programa ClustalW2 de EBI. En la secuencia se resaltan los dominios de transporte de iones (subrayada con línea continua para la isoforma $\alpha 1A$ y línea punteada para *T. evansi*), los dominios transmembrana (gris oscuro para $\alpha 1A$ y gris claro para los predichos en *T. evansi*). El filtro de selectividad, Región P se resalta en amarillo marcándose en rojo el aa de selectividad. En rojo se marcan los aa de carga positivos presentes en los dominios transmembrana M4 y dominio de unión CaM (iQ) (Amarillo) Epitope. Las secuencias utilizadas en el alineamiento corresponden: *T. evansi* (secuencia problema). *T. brucei* (NCBI # XP 822541.1 GI: 71746972). *Leishmania major* (# NCBI XP 001686138.1 GI: 157875495 *T. cruzi* (# NCBI XP 819699.1 GI: 71665459) y *Homo sapiens* (#NCBI AAB64179.1GI: 2281752)

Sobre la secuencia de *T. evansi* alineada en la figura 62, se resaltan los posibles dominios transmembrana de alta confiabilidad predichos por los programas **TopPred** y **HMMTOP** así como posibles regiones que pudieran formar parte de estos dominios, las cuales remarcamos en color rojo dado a su alta homología con la secuencia de la

subunidad $\alpha 1A$ de *Homo sapiens*, la cual ha sido altamente caracterizada. Este alineamiento nos permitió sugerir el modelo mostrado en la figura 63.

Dicho modelo comparte alta homología con el de las subunidades $\alpha 1$ de canales de Ca^{2+} descritos en eucariotas superiores en los cuales se destacan: cuatro dominios de transporte de iones de seis dominios transmembrana cada uno. Dentro de estos dominios transmembrana cabe destacar al dominio M4 el cual por lo general contiene residuos aminoacídicos de carga + como K y R los cuales participan directamente en el transporte de cationes a nivel del poro. Con respecto a estos dominios transmembrana cargados positivamente, en nuestra secuencia, observada en el alineamiento de la figura 62, no siempre el dominio transmembrana M4 contenía dichos residuos, sin embargo muy adyacente a esas regiones se disponían dichos residuos en el motivo característico del segmento M4 de canales descritos en eucariotas (K/R- XX-K/R -XX -K/R, siendo X un aminoácido hidrofóbico) (Bezanilla, 2005). Estos motivos fueron señalados sobre la figura 62, posiblemente estos formen parte del dominio transmembrana tal como ocurre en el caso de eucariotas superiores y por ser regiones poco hidrofóbicas los programas utilizados para el análisis topológico de la secuencia no lo consideran parte del dominio transmembrana.

Por otra parte en nuestro modelo señalamos los posibles dominios P o filtro de selectividad resaltando el residuo expuesto en la cara del poro. Con respecto a este dominio altamente conservado en eucariotas superiores y en donde se mantiene los motivos FXXTXEGW y FXXTGEXW (siendo E el residuo de selectividad y X cualquier aa), en la secuencia del putativo canal de Ca^{2+} de *T. evansi* solo encontramos dos dominios que comparten estas características, teniendo los otros dos sustituidos los residuos E por Q y S respectivamente. En la figura 63 B se muestra un la posible orientación espacial de nuestra secuencia, la cual se adapta a los modelos predichos para esta subunidad en eucariotas superiores.

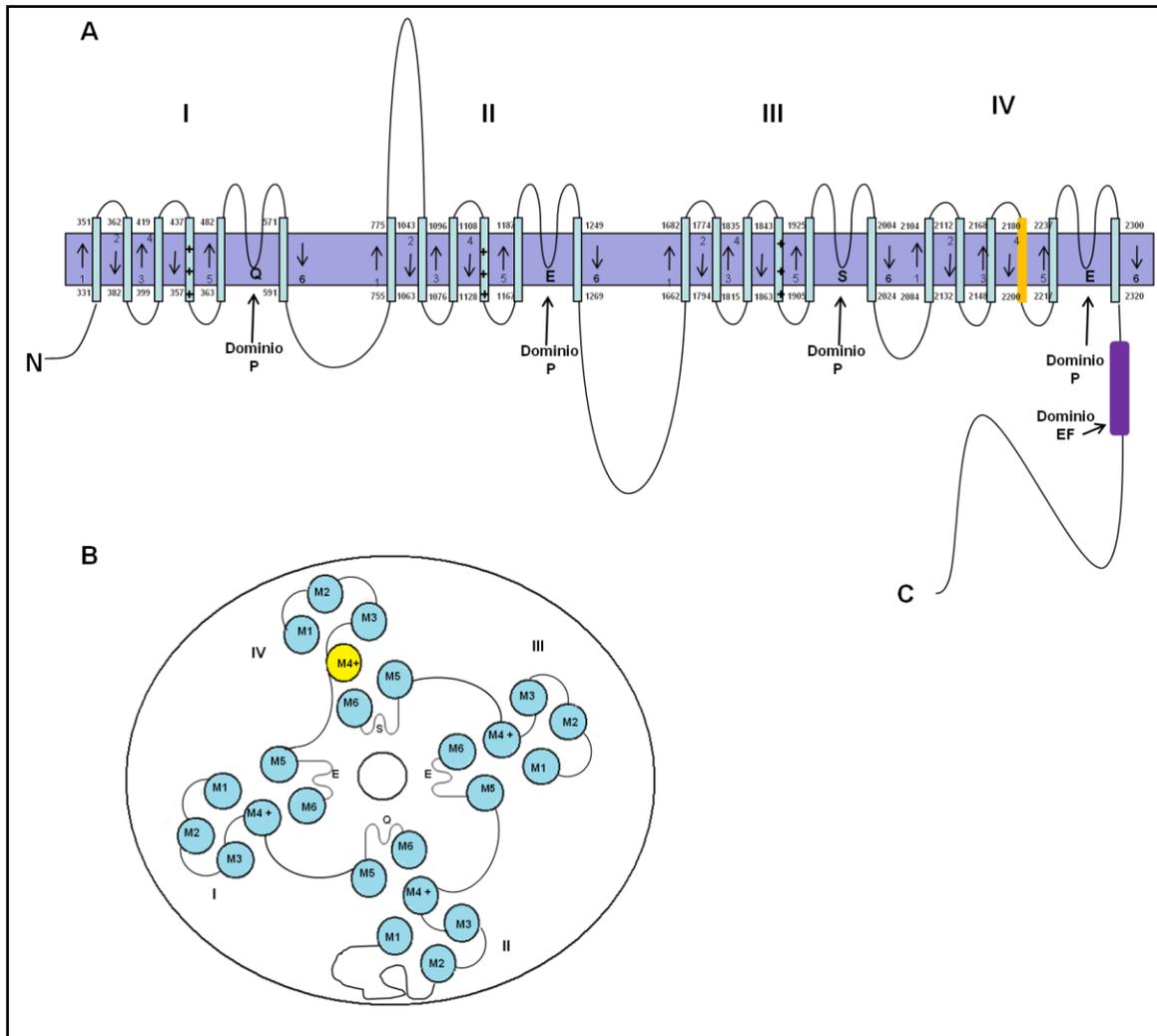


Figura 63. Modelo Topológico del putativo Canal de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*. A. El esquema muestra los principales dominios Transmembrana encontrados en la secuencia del putativo canal de Ca^{2+} de *T. evansi* predicha por los programas TopPred y HMMTOP. Las flechas indican la orientación de los dominios transmembrana. También se destacan sobre el modelo los 4 posibles dominios de transporte de iones (I-IV). El dominio P o poro del canal. B Posible orientación espacial de nuestra secuencia donde los residuos QESE quedan de cara al poro del canal. Modelo tomado y modificado de Benoff y col., 2007.

Modelo Topológico del Putativo Canal de Ca^{+2} de *Trypanosoma evansi*

Al igual como se hizo con las secuencias anteriores de *T. evansi*, la secuencia obtenida fue enviada al servidor “Phyre” **Protein homology analogy recognition engine** (Kelley. L. Y Sternberg, 2009). En este caso y dado a lo larga de la secuencia la misma fue enviada al servidor en cuatro partes. Estas partes corresponden a las 4 posibles regiones de transporte de iones predichos por el programa **InterProScan**. Las cuatro regiones modeladas corresponden a las secuencias aminoacídicas: modelo 1 (1- 600) modelo 2

(600-1300), modelo 3 (1300 - 2100) y modelo 4 (2200- final). Esta distribución permitió modelar cada una de las 4 posibles regiones de transporte de ión características de la subunidad α de canales de Ca^{2+} .

En la figura 64, se observan las 4 posibles regiones identificadas del **I** - **IV** y sobre cada uno de ellos se identifican los dominios transmembrana así como el dominio P o filtro de selección del catión. Debido a que cada uno de las 4 regiones de transporte de iones, identificados en la secuencia, fueron modelados de manera independiente, los plantados utilizados para la predicción del modelo tridimensional de cada dominio, por parte del servidor, no fueron los mismos. Para el dominio **I**, el servidor modeló un 37% de la secuencia con una confiabilidad >90 % utilizando 2 plantados modelos identificados con los números PDB d1ors y C2r9rH (Canal de K^+ tipo KvAP de *Archaeon Aeropyrum pernix* y canal de K^+ tipo Kv 1.2 Kv 2.1 de (Long y col., 2007) respectivamente). Para el dominio II, el servidor modeló el 30 % de la secuencia con una confiabilidad >90 % utilizando como 2 plantados identificados como C2r9rH (Long y col., 2007) y C2vefB (correspondiente a una Dihidrotorato sintetasa de *Streptococcus pneumoniae* (Levy y col., 2008)). La región III fue modelada en un 29 % con una confiabilidad >90 % utilizando como único plantado C2r9rH (Long y col., 2007). Por último, la región **IV** fue modelada en un 55 % con una confiabilidad >90 % usando 7 plantados identificados con los PDB C2r9rH (Long y col., 2007), C2KbiA (Canal de Na^+ isoforma Nav 1.2 de Homo sapiens, Chagot y col., 2009), C3dvmb (Estructura cristalina de dominio IQ de canales de Ca^{2+} CaV2 (Kim y col., 2008)), C2be6F (Dominio IQ de canales de Ca^{2+} CaV1.2 (Petegem y col., 2005)), C3g43F (Dominio IQ de canales de Ca^{2+} CaV1.2 (Fallon y col., 2009)) y C3bxKD (Dominio IQ de canales P/Q CaV2.1 (Mori y col., Publicación en prensa)).

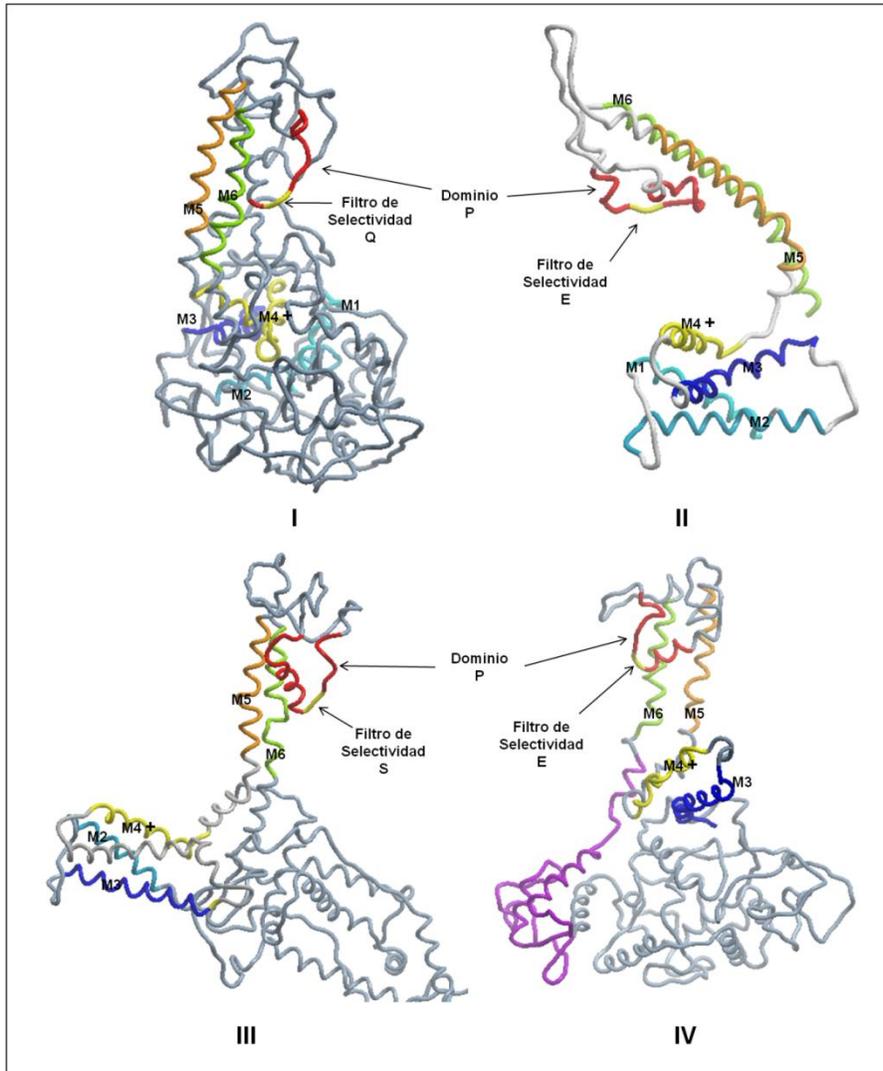


Figura 64. Modelo Tridimensional del putativo canal de Ca^{2+} de *Trypanosoma evansi*. Modelo 3D de las 4 posibles regiones de transporte de cationes del putativo canal de Ca^{2+} en *T. evansi* obtenidas a través del servidor Phyre y visualizadas en el programa Molsoft. En la figura se destacan los posibles de dominios P o filtro de selectividad (rojo identificando en amarillo el residuo de selectividad), el dominio M4 de carga positiva (amarillo), Dominios M1, M2 y M3 (azul), dominio M5 (naranja) y dominio M6 en (verde).

4.2.3. Evidencias inmunológicas de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*

Los resultados mostrados hasta ahora, nos sugieren la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} de *T. evansi*. La aproximación mediante ensayos inmunológicos nos permitirá validar las evidencias fisiológicas y moleculares obtenidas. Para ello, utilizamos anticuerpos primarios, comerciales y específicos, producidos en contra de la PMCA, SERCA y el Canal de Ca^{2+} de eucariotas superiores

4.2.3.1. Reconocimiento inmunológico de las posible proteínas involucradas en la homeostasis del Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi* mediante inmunotinción

Con el propósito de identificar inmunológicamente a las proteínas homologas a PMCA, SERCA y canal de Ca^{2+} , involucradas en la homeostasis del Ca^{2+} en *T. evansi*, se procedió a realizar inmunotinciones empleando los anticuerpos específicos correspondientes (Tabla 7).

En la figura 65, se muestran las inmunotinciones realizadas, se puede apreciar el reconocimiento de algunas bandas, debido a la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos específicos utilizados contra las proteínas presentes en el las fracciones de *T. evansi* empleadas. En todos los casos se evaluó el reconocimiento de los anticuerpos secundarios empleados en contra de la fracción antigénica, no obteniéndose reconocimiento alguno (resultados no mostrados).

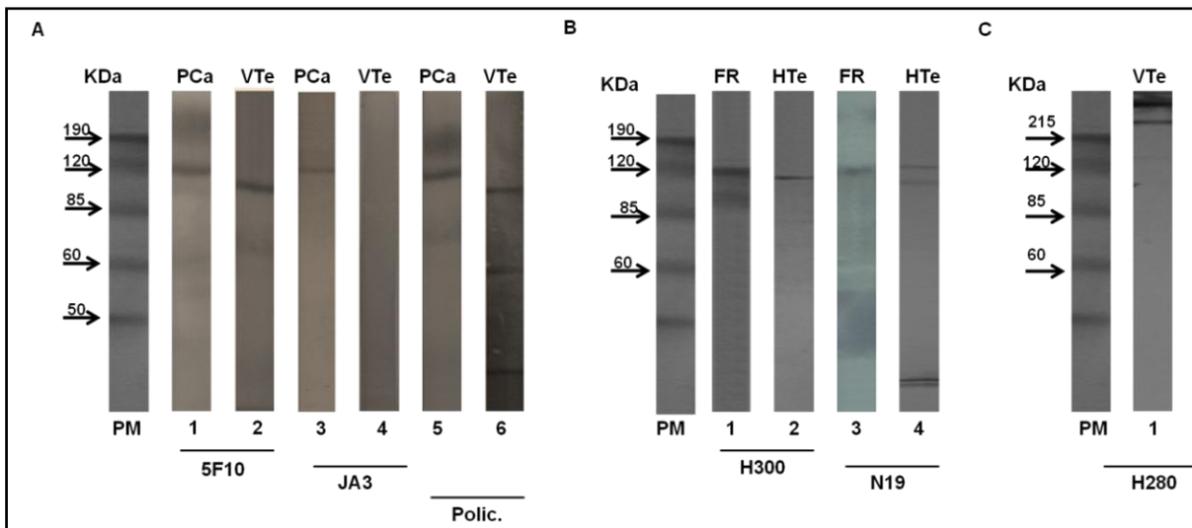


Figura 65. Inmunomarcaje de fracciones de membrana plasmática y homogenato de *Trypanosoma evansi*. Reconocimiento de las Ca^{2+} -ATPasas tipo PMCA y SERCA y de posible Canal de Ca^{2+} en *T. evansi*. **A.** Inmunomarcaje de posible PMCA de *T. evansi* por los anticuerpos 5F10, JA3 y Anticuerpo policlonal dirigido contra Ca^{2+} -ATPasas de eritrocitos humanos. Los carriles indican: Marcador de peso molecular (PM), 1, 3 y 5 Ca^{2+} ATPasa Purificada de eritrocitos humanos (PCA) 2, 4 y 6 Vesículas de membrana plasmática de *T. evansi* (VTe). **B.** Inmunomarcaje de posible SERCA de *T. evansi* por los anticuerpos H300 y N19. Los carriles indican: Marcador de peso molecular (PM), 1, 3 Fracción subcelular enriquecida de retículo purificada de musculo de conejo (FR) 2 y 4 Homogenato de *T. evansi*. **C.** Inmunomarcaje de posible Canal de Ca^{2+} de *T. evansi* por el anticuerpo H280. Las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se listan en la tabla 7.

En la figura 65 A, se puede observar que tanto el anticuerpo 5F10, como el AcPoliPMCA, pudieron reconocer sobre la fracción de proteínas de membrana plasmática de *T. evansi*, una banda de aproximadamente 120 KDa, mientras que el anticuerpo JA3, no mostró ningún reconocimiento. Nótese que todos los Ac- α -PMCA empleados reconocen dos bandas de aproximadamente 135 y 140 kDa las cuales corresponde a las dos isoformas de Ca²⁺-ATPasa purificadas de eritrocitos humanos. En la figura 65 B, se puede observar que ambos anticuerpos específicos, H 300 y N19, producidos contra las proteínas tipo SERCA, pudieron reconocer una banda de aproximadamente 100 KDa en el homogenato de *T. evansi*. Nótese que los Ac- α -SERCA reconocen una banda de 120 kDa en la fracción subcelular enriquecida de retículo obtenida a partir de músculo esquelético de conejo. Adicionalmente, en la figura 65 C, se puede observar el reconocimiento, por parte del anticuerpo H280, de dos banda de masa molecular superior a los 215 kDa, aproximadamente 250 y 300 kDa en la fracción de proteínas de membrana plasmática de *T. evansi*. Cabe destacar, el reconocimiento por parte de algunos anticuerpos utilizados, de bandas de masa molecular inferior a la esperada, las cuales podrían ser producto de variaciones de la proteína, degradación o proteólisis, o un reconocimiento inespecíficos por parte del anticuerpo.

4.2.3.2. Inmunolocalización de las posible PMCA, SERCA y Canal de Ca²⁺ en *Trypanosoma evansi*, mediante el uso de microscopia confocal

Los anticuerpos primarios 5F10, H300 y H280 producidos en contra todas las isoformas de la PMCA, SERCA y el Canal de Ca²⁺ tipo L respectivamente, fueron empleados simultáneamente con anticuerpos α -tubulina y α - DYNLL1/2, proteínas del citoesqueleto, para el marcaje de la superficie del parásito y Tapsigargina Body-Py, para el marcaje del retículo endoplasmático para establecer la inmunolocalización de estas proteínas *T. evansi*. Lamentablemente, el anticuerpo 5F10 produjo un tenue e inespecífico reconocimiento (resultado no mostrado), por lo que no se procedió al doble marcaje. Los resultados obtenidos con los otros anticuerpos se muestran a continuación.

En la figura 66-1, se puede observar el reconocimiento del anticuerpo H300 (parte a) al igual que el marcaje producido por la Tapsigargina Bogy-Py (parte b), ambos sobre una región dentro del citosol del parásito, rodeando el núcleo. La colocalización se corroboró a través del co-marcaje, señalado en amarillo, en la parte c de la figura, así como por la prueba de colocalización, la cual indica los puntos calientes, señalados en blanco, en la parte de la figura.

En la figura 66-2 A y B, se observa que el anticuerpo H280, presentó un reconocimiento en la superficie del parásito (parte a), particularmente un intenso marcaje en el periferia de este. Igualmente, el anticuerpo α -Tubulina (parte 2Ab) presentó un reconocimiento con la misma distribución. La prueba de colocalización de puntos calientes (parte e) y la prueba de co-localización de Threshold (parte f) muestran que ambos anticuerpos están reconociendo proteínas presentes en la membrana plasmática.

Para tratar de estudiar si el anticuerpo H280 reconoce a una proteína embebida en la membrana plasmática o simplemente una adyacente a esta, procedimos a hacer otro doble marcaje esta vez utilizando, anticuerpo dirigido contra la Dineína, proteína constituyente del citoesqueleto y la cual como puede observarse en la figura 2 B b marca la cara interna de la membrana plasmática. Como se observa en la figura y se corrobora con las pruebas de colocalización estos anticuerpos colocaliza en menor grado que cuando se utiliza anti tubulina.

El uso de un sistema de imágenes confocal conjuntamente con la realización de un doble marcaje nos permitió establecer los puntos calientes o de coincidencia del doble marcaje donde se muestra en blanco, sobre la imagen analizada únicamente las zonas donde los dos marcadores coinciden. La otra prueba de colocalización utilizada es la de Threshold en la cual se evalúa la colocalización en base a una regresión lineal.

4.2.3.3. Inmunoprecipitación

A partir de la fracción enriquecida en membrana obtenida de *T. evansi*, procedimos a realizar una inmunoprecipitación con los anticuerpos 5F10, H300 y H280. Como se puede observar en la figura 67 A y B y C los tres anticuerpos fueron capaces de precipitar sus antígenos correspondientes cuyas masas moleculares, identificadas con una flecha, son aproximadamente de 116 kDa para la posible PMCA, 100 kDa para la posible SERCA y 300 kDa para el posible canal de calcio, las corresponden a la de las bandas identificadas en los inmunomarcajes presentados anteriormente, así como otra serie de proteínas de menor masa molecular, las cuales pueden estar asociadas o formando complejos con el antígeno precipitado. Por otra parte cabe destacar las bandas de alta intensidad de peso molecular inferior a las bandas de interés, mostradas en las figuras 67 A y B, las cuales parecen corresponder a las inmunoglobulinas pues el mismo patrón de banda coincide para ambos anticuerpos.

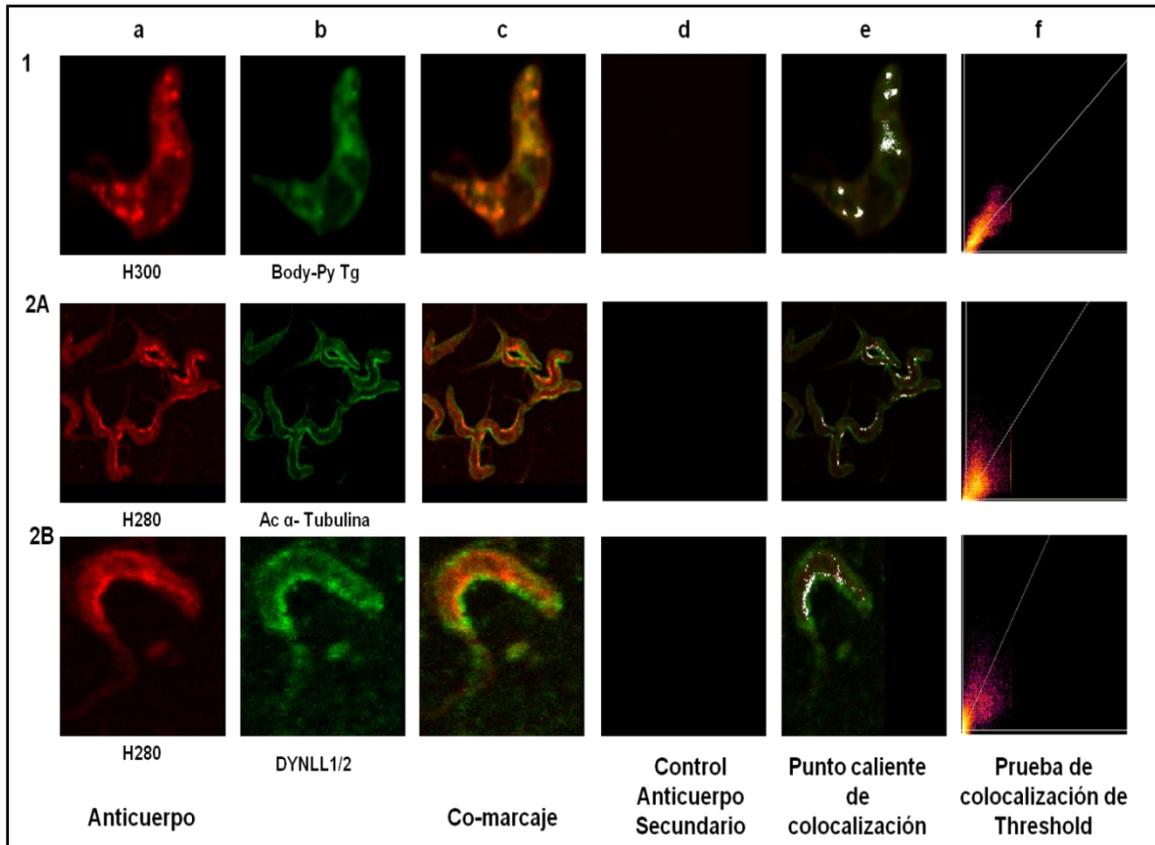


Figura. 66. Inmunolocalización de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*. Inmunomarcaje de *T. evansi* enteros y fijados en placas de polilicina. La dilución de los anticuerpos usados y sus respectivos anticuerpos secundarios se listan en la tabla 8. **1.** Inmunolocalización de posible SERCA de *T. evansi* utilizando el anticuerpo H300 y el marcador de retículo tapsigargina bodi- py. **2 A.** Inmunolocalización de posible Canal de Ca^{2+} en *T. evansi* utilizando los anticuerpos H289 y α -tubulina. **2 B.** Inmunolocalización de posible Canal de Ca^{2+} en *T. evansi* utilizando los anticuerpos H289 y DYNLL1/2 . en todos los casos: **(a)** corresponde al anticuerpo 1. **(b)** al anticuerpo (exceptuando 1b donde se utilizo el marcador fluorescente de retículo Tg bodi- py). **(c).** la colocalización del ambos anticuerpos. **(d)** control anticuerpo secundario. **(e)** prueba de colocalización de punto caliente. **(f)** prueba de colocalización de Thershold.

Los resultados mostrados en esta parte de nuestro trabajo nos permiten sugerir cierta semejanzas estructurales entre las proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} de *T. evansi* con sus homologas en eucariotes superiores. Hecho que podemos corroborar con su reconocimiento por parte de anticuerpos específicos dirigidos contra PMCA, SERCA y Canal de Ca^{2+} de humanos.

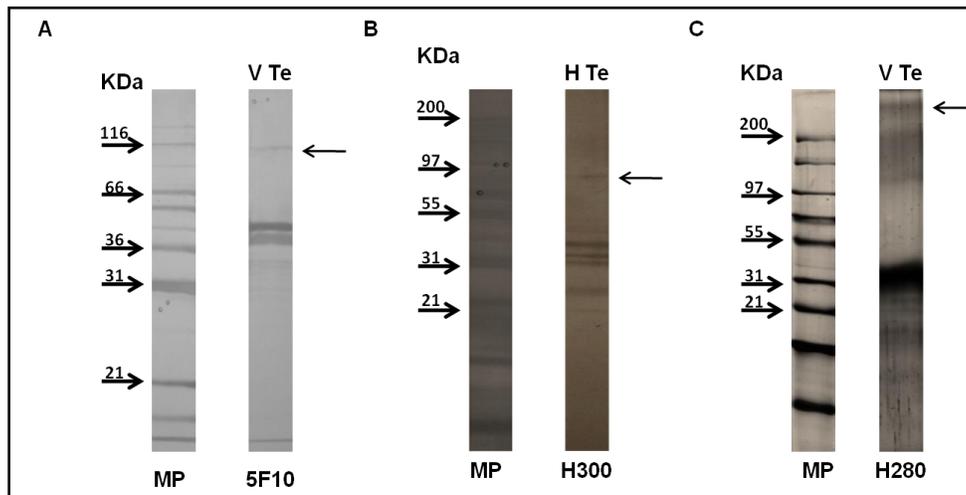


Figura. 67. Inmunoprecipitación de posible PMCA, SERCA y Canal de Ca²⁺ de *Trypanosoma evansi*. A. Inmunoprecipitación de posible PMCA de *T. evansi* con el anticuerpo 5F10. Esta inmunoprecipitación se realizó a partir de fracciones de membrana plasmática de *T. evansi*. La flecha indica la banda de interés B. Inmunoprecipitación de posible SERCA de *T. evansi* con el anticuerpo H300. Esta inmunoprecipitación se realizó a partir de homogenato de *T. evansi*. La flecha indica la banda de interés C. Inmunoprecipitación de la posible subunidad α del putativo canal de Ca²⁺ de *T. evansi* con el anticuerpo H280 Esta inmunoprecipitación se realizó a partir de fracciones de membrana plasmática de *T. evansi*. La flecha indica la banda de interés.

4.2.4. Evidencias bioquímica de la presencia de la posible Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma evansi*

Dado a que las Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA se caracterizan y diferencian de las demás Ca²⁺-ATPasa por su modulación por parte de la CaM y a que la secuencia reportada como posible PMCA de *T. evansi* carece de un dominio clásico de unión a CaM, aun cuando el programa “**Calmodulin target Database**” nos predice un dominio putativo de unión a la proteína. Procedimos a evaluar la posible modulación de la actividad de esta PMCA de *T. evansi* por parte de CaM.

4.2.4.1. Evaluación de la actividad Ca²⁺-ATPasa en vesículas de membrana plasmática de *Trypanosoma evansi*

Para evidenciar la posible presencia de una bomba de Ca²⁺ tipo PMCA en *T. evansi*, procedimos a medir la actividad Ca²⁺-ATPasa en la fracción vesículas de membrana plasmática de *T. evansi*, mediante la técnica descrita por Fiske y Subarrow (1925). Los resultados se muestran en la figura 68, y en ella se puede observar el aumento de la actividad basal Ca²⁺-ATPasa en presencia de 10 μ M Ca²⁺ de aproximadamente el doble cuando al medio de reacción se le adiciona 5 μ g/ml de CaM.

Por otra parte en la figura se puede observar que cuando se utiliza una CaM purificada a partir de tripanosomatidio (*T. cruzi*) hay un aumento significativamente mayor de la Vmax alcanzada.

Este resultado no solo corrobora la presencia de una posible PMCA en la membrana plasmática de *T. evansi* sino que corrobora que ésta es modulada por la CaM de manera similar a las de sus homólogos en eucariotas superiores.

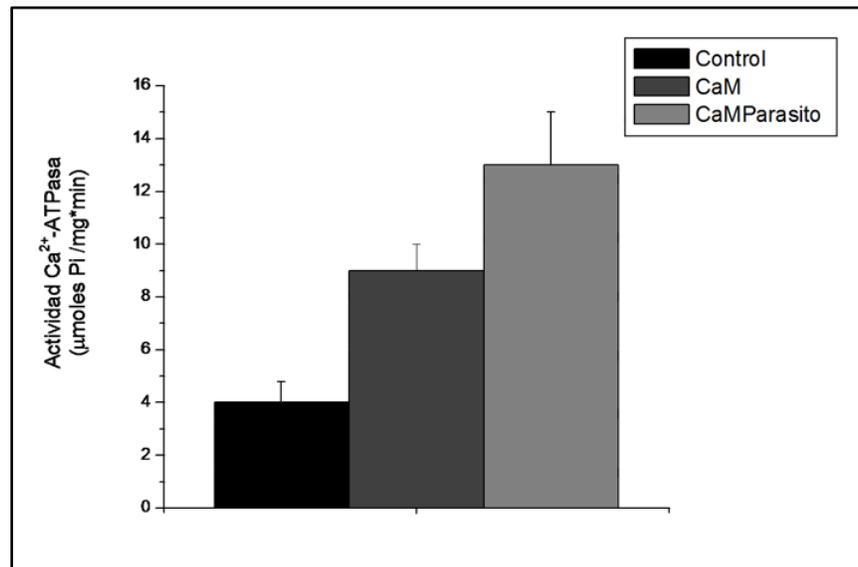


Figura.68. Actividad Ca²⁺-ATPasa en vesículas de membrana plasmática de *Trypanosoma evansi* y su estimulación por Calmodulina. Actividad determinada por método de Fiske y Subarrow 1925. Todas las determinaciones fueron realizadas en presencia de 2 mM ATP y en un medio contentivo de CaCl₂ 10µM. Los resultados mostrados son el producto de al menos 6 ensayos independientes y todas las condiciones tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí y con respecto al control con un $p \leq 0.01$.

4.2.4.2. Marcaje de la posible Ca²⁺-ATPasa de membrana de *Trypanosoma evansi* con CaM Biotinilada.

Para evaluar la interacción entre la CaM y la posible PMCA de *T. evansi*, procedimos a electrotransferir a papel de nitrocelulosa fracciones de membrana plasmáticas de este parasito y posteriormente las incubamos con CaM-Biotinilada en presencia y ausencia de Ca²⁺. En la figura 69 A, se puede observar el reconocimiento de la PMCA purificada a partir de eritrocitos humanos y de una banda de masa molecular ligeramente inferior, de aproximadamente 120 KDa, sobre las fracciones de membrana de *T. evansi* en presencia de Ca²⁺. Contrariamente, en ausencia de Ca²⁺ (figura 69 B) no se

observo ningún marcaje con CaM-Biotinilada, indicando que la interacción entre estas dos proteínas es dependiente de Ca^{2+} en el medio.

Este resultado nos sugirió la posible purificación de esta enzima mediante el uso de una columna de afinidad de CaM-Sefarosa.

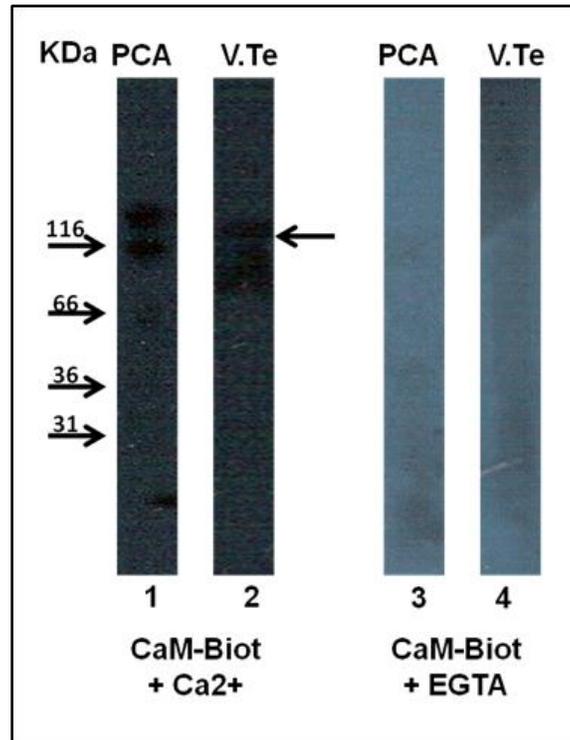


Figura. 69. Reconocimiento de posible PMCA de *Trypanosoma evansi* con Calmodulina Biotinilada. Marcaje con CaM-Biotinilada en fracciones de membrana de *T. evansi*. Los carriles 1 y 3 corresponden a PMCA purificada a partir de eritrocitos Humanos. Carriles 2 y 4 corresponden a vesículas de membrana plasmática de *T. evansi*. La reacción con CaM-Biotinilada se realizó en presencia y ausencia de Ca^{2+} .

4.2.4.3. Purificación de la posible Ca^{2+} -ATPasa de membrana (Cromatografía de afinidad con CaM-Sefarosa)

Las fracciones de membrana de *T. evansi* previamente solubilizadas fueron pasadas por una columna de CaM-Sefarosa para tratar de purificar la enzima. El resultado de dicha purificación puede observarse en la figura 70 donde el eluato de la columna tras la eliminación del Ca^{2+} del medio permitió la obtención de una banda única de peso molecular ligeramente inferior a 120 KDa.

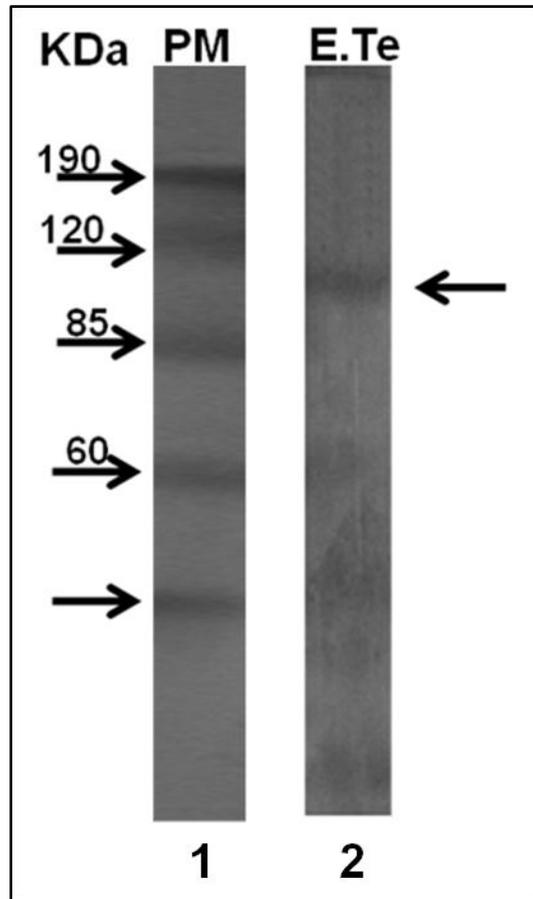


Figura. 70. Purificación de posible Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA de *Trypanosoma evansi* por cromatografía de afinidad en columna CaM-Sefarosa. El carril 1 marcador de peso molecular. Carril 2 fracción eluida de la columna al quelar el Ca^{2+} con la adición de EDTA.

Estos resultados nos sugieren la presencia de una posible PMCA en la membrana plasmática de *T. evansi*, la estimulación de esta enzima por parte de la CaM también sugiere que es funcionalmente similar a sus homólogas en eucariotas superiores.

5.- Discusión

5.1. Modulación de la Ca^{2+} -ATPasa 4b de humanos por etanol y segundos mensajeros de origen lipídicos

5.1.1. Estandarización del Sistema de Expresión en células COS-7

En los últimos 20 años, el uso de técnicas moleculares han permitido un gran avance en el estudio y caracterización de proteínas, tal es el caso de las diferentes isoformas de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, las cuales desde hace más de 15 años vienen siendo estudiadas de manera independiente gracias al uso de sistemas de expresión. Por tal motivo y con la finalidad de profundizar en el estudio del efecto del etanol y diferentes segundos mensajeros sobre la actividad de la PMCA4b nos propusimos en primer lugar estandarizar en nuestro laboratorio, la expresión de la isoforma PMCA4b y de las diferentes formas truncadas de esta enzima en el sistema de expresión de mamíferos COS, sistema que ha sido estandarizado para la expresión de las diferentes isoformas de PMCA por Heim y colaboradores en 1992.

La escogencia del sistema de expresión en células COS, se realizó en base a las ventajas que ofrece este sistema sobre los utilizados en bacterias y levaduras, como son permitir la síntesis y el debido procesamiento post-transduccional de las proteínas de interés, condiciones de gran importancia en nuestro caso en el cual expresamos una proteína integral de membrana y necesitamos que la misma sea funcional y migre correctamente a la membrana plasmática sin quedar retenida en el retículo endoplasmático o en el aparato de Golgi. En este sentido, COS es un excelente sistema de expresión transitorio, dado a que cuenta con la presencia del gen SV40T el cual tiene la habilidad de permitir la replicación episomal de plásmidos que presentan el sitio de origen SV40 y por otra parte, porque existe en estas células la maquinaria necesaria para las modificaciones post-transduccionales que requiere nuestra enzima para su correcto anclaje a la membrana plasmática y para ser funcional. Sin embargo, existen algunas desventajas de este sistema como son: 1) los bajos niveles de sobre expresión de las proteínas de interés en las células COS, que pudieran limitar los estudios de caracterización funcional de las enzimas y 2) que las células COS tienen una PMCA endógena, por lo cual, debemos poder discernir en nuestros estudios entre la actividad de esta enzima y la de las isoformas que estamos expresando y queremos estudiar. Sin embargo y como pudimos demostrar en este trabajo, ambas limitaciones del método pudieron ser resueltas ya que por una parte, la isoforma endógena de la PMCA

corresponde a la isoforma PMCA1b y las proteínas nativas y truncadas expresadas que se estudiaron corresponden a la isoforma PMCA4b, por lo que ambas proteínas pueden ser visualizadas y caracterizadas con el uso de anticuerpos específicos para cada una de ellas, pudiéndose determinar la sobreexpresión de las enzimas de interés en estas células (Fig. 12). Por otra parte, los niveles de expresión de la PMCA4b silvestre y de las formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ fueron significativamente superior a la expresión de la isoforma endógena (Fig. 12), siendo las cantidades de las diferentes enzimas expresadas suficientes para poderlas caracterizar funcionalmente (Fig. 13). A la actividad determinada en las distintas proteínas expresadas se les pudo restar la actividad correspondiente a la proteína endógena pudiéndose así caracterizar en ellas, el efecto de los moduladores de interés en este estudio.

Una vez escogido el sistema de expresión, para poder expresar la isoforma 4b de la PMCA y las tres formas truncadas de esta enzima: $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ tuvimos que clonar los genes que codifican para las diferentes proteínas en el plásmido pSG5, un plásmido de expresión en COS, el cual tiene un sitio promotor fuerte (T7) previo a los sitios de restricción donde son insertadas las secuencias de las proteínas de interés, a partir del cual van a ser expresadas nuestras enzimas. Las secuencias de los genes correspondientes a la PMCA4b, PMCA $\Delta 44$, PMCA $\Delta 118$ y PMCA $\Delta 139$ habían sido previamente clonadas en el plásmido pVL1393, un plásmido muy utilizado para la expresión de proteínas en células de insecto Sf9 mediante un sistema de expresión por baculovirus. Estas secuencias habían sido clonadas en los sitios de restricción *Bam*HI y *Kpn*I, por lo que se obtuvieron mediante digestión con estas enzimas y su posterior purificación. Dado a que los insertos purificados presentan en sus extremos 5' y 3' los sitios de restricción para *Bam*HI y *Kpn*I respectivamente y el plásmido pSG5 presenta ambos sitios de restricción en su sitio de múltiple clonamiento, las secuencias correspondientes a las proteínas a expresar fueron ligadas en el plásmido pSG5 sin ningún inconveniente (Fig.9 y 10).

Una vez clonados los fragmentos con las secuencias correspondientes a la proteína nativa PMCA4b y a las formas truncadas PMCA4b $\Delta 44$, PMCA4b $\Delta 118$ y PMCA4b $\Delta 139$ en el plásmido de expresión pSG5, y antes de expresar las proteínas en las células COS-7, se realizó una caracterización de las secuencias clonadas mediante un análisis de restricción. Por una parte, se utilizaron las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I, las cuales como puede observarse en la figura 11 C, permitieron recuperar los distintos fragmentos

insertados, ya que el plásmido sólo presenta estos sitios de restricción en los extremos donde se clonaron las secuencias y por otra parte, con la enzima *EcoRI* la cual corta el plásmido con las secuencias insertas en tres zonas, marcadas con: *EcoRI*1043, *EcoRI*3239 y *EcoRI*4465 (Ver Fig. 11 D). Sin embargo, el sitio de restricción *EcoRI*4465, el cual se encuentra al final de la región C-terminal de la PMCA4b, es eliminado en las secuencias que codifican para las diferentes proteínas truncadas PMCA4b Δ 44, Δ 118 y Δ 139, ya que se pierden 44, 118 y 139 aa respectivamente en la región C-terminal de la proteína, razón por la cual se pierde este sitio de restricción observándose únicamente dos bandas en las formas truncadas con respecto a las tres bandas esperadas y encontradas en la forma nativa de la enzima (Fig. 11 B). Como puede observarse en los resultados, el análisis de restricción encontrado correspondió al esperado para cada una de nuestras secuencias clonadas (Fig. 11 A-D).

Los plásmidos caracterizados fueron utilizados entonces para la expresión de las diferentes proteínas en las células COS-7. Como puede observarse en la Fig. 12, la PMCA4b y las distintas proteínas truncadas Δ 44, Δ 118 y Δ 139 fueron correctamente expresadas en las membranas de dichas células. Las proteínas expresadas fueron caracterizadas con el uso de dos anticuerpos diferentes, en primer lugar con el anticuerpo monoclonal 5F10, el cual reconoce una región específica y altamente conservada en todas las isoformas de la PMCA de humanos, entre los aminoácidos 724 y 783 de la proteína, pudiendo este anticuerpo hibridar con la isoforma endógena de la PMCA en las células COS-7 (PMCA1b) y con la isoforma PMCA4b nativa y truncadas expresadas en estas células. Como puede observarse en los resultados, este anticuerpo reconoció dos bandas correspondientes a las PMCA1b (endógena) y la PMCA4b nativa y truncadas, mostrando asimismo una diferencia en el nivel de expresión de las enzimas de interés con respecto a la proteína endógena (Fig. 12 A) En el carril correspondiente a las células transfectadas con la isoforma silvestre de la PMCA 4b se observa 1 banda de peso molecular aproximado de 135 KDa cuyo reconocimiento es más intenso al observado en membranas de COS-7 no transfectadas. Esto nos indicó que las proteínas nativas y truncadas estaban siendo correctamente expresadas en nuestro sistema y que su expresión puede ser diferenciada de la expresión de la proteína endógena de estas células. Es importante mencionar, que en el caso de la proteína nativa y la forma truncada Δ 44, sus tamaños moleculares no difieren en gran medida del tamaño de la proteína endógena, 134,7 KDa para PMCA1b, 133,9 KDa para la isoforma PMCA4b y 131 KDa para la PMCA4b Δ 44, por lo cual no pueden observarse de manera definida las dos

bandas que se observan claramente en las formas truncadas $\Delta 118$ y $\Delta 139$. Sin embargo, la utilización de otro anticuerpo monoclonal específico para la isoforma PMCA4b, el JA3, el cual reconoce una secuencia específica comprendida entre los aa 1135-1205 (Adamo y col., 1992a) pudo mostrar con mayor especificidad la expresión de la proteína nativa y la forma truncada $\Delta 44$ en las células COS-7 (Fig. 12 B). En este caso, es importante mencionar que el anticuerpo JA3 solo reconoce una región de 70 aa presentes en el extremo C-terminal de la enzima expresada y como puede verse en los resultados, sólo reconoció una banda de PM aparente de 135 KDa en el carril correspondiente a la COS-7 transfectadas con la isoforma PMCA 4b y de manera más tenue a una banda de PM similar en el carril correspondiente a las COS-7 transfectadas con la forma truncada $\Delta 44$ (Fig. 12 B). No observándose reconocimiento alguno en las células COS no transfectadas dado a que estas células solo poseen la isoforma 1B, no reconocida por este anticuerpo, ni en las células COS transfectadas con las formas truncadas $\Delta 118$ y $\Delta 139$, debido a que estas formas carecen del dominio de 70 aa reconocido por este anticuerpo como se observa en el esquema de la figura 12 C. En la forma truncada $\Delta 44$, el reconocimiento fue más tenue pues al truncar la proteína se pierde parte del epítipo reconocido por el anticuerpo JA3 (Fig. 12 C).

La funcionalidad de las enzimas expresadas, la determinamos midiendo los niveles de fósforo inorgánico liberado por éstas en fracciones de membrana transfectadas, utilizando para ello el método de Fiske y Subbarow 1925. En las figuras 13 A y 13 B se puede observar que la actividad basal de las células COS-7 transfectadas con la isoforma silvestre PMCA 4b aproximadamente triplica la actividad observada en las células COS no transfectadas, donde la actividad observada corresponde a la isoforma endógena de esta enzima (PMCA1b) en dichas células. Estos resultados fueron consecuentes con los obtenidos por Adamo y colaboradores en 1992b y por Heim y colaboradores en el mismo año. Por otra parte, se puede observar también en esta figura que tanto la enzima endógena como la PMCA4b silvestre y la PMCA4b $\Delta 44$ son estimuladas por CaM. Por el contrario, las formas truncadas PMCA4b $\Delta 118$ y PMCA4b $\Delta 139$ no mostraron estimulación por parte de CaM, pero sus actividades basales fueron similares a la actividad de las formas silvestre y $\Delta 44$ obtenida en presencia de CaM. Este hecho se explica por la falta del dominio autoinhibitorio de CaM, el cual se encuentra en la región C-terminal que ha sido eliminada en las formas truncadas PMCA4b $\Delta 118$ y PMCA4b $\Delta 139$ (Fig 12 C). Estos resultados son sumamente importantes pues nos demostraron que el sistema de expresión escogido puede ser utilizado para expresar de manera funcional a la isoforma

PMCA4b así como las tres formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ de esta enzima. Observándose un nivel de actividad Ca^{2+} -ATPasa basal para cada una de estas proteínas expresadas significativamente superior a la actividad Ca^{2+} -ATPasa endógena de las células COS-7, lo que permitió establecer al sistema de expresión COS como un sistema óptimo para el estudio de la actividad de la PMCA4b y las formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ (Fig. 14) permitiéndonos así estudiar y caracterizar en estas proteínas expresadas el efecto de los moduladores de interés en este trabajo.

5.1.2. Efecto del Etanol sobre la forma truncada $\Delta 118$

Una vez estandarizado el sistema de expresión de las proteínas de interés, procedimos a estudiar el efecto del etanol sobre nuestras formas expresadas. Trabajos previos demostraron que concentraciones farmacológicas de etanol, afectan la homeóstasis del calcio en las células mediante la inhibición de canales tipo voltaje dependientes para el catión (Harris y Allan, 1985) y la modulación de la Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplasmático y de membrana plasmática (Melgunov y col, 1987 y Benaim y col., 1994). Efectos que pueden ser directos sobre las enzimas mencionadas o consecuencia de alteraciones en la fluidez o propiedades de la membrana producidos por el alcohol.

Benaim y colaboradores en 1994 demostraron que a concentraciones farmacológicas (0.1 a 0.5 %) (Gandhi y Ross, 1989), el etanol es capaz de estimular tanto a la Ca^{2+} -ATPasa purificada de eritrocitos humanos, como a la enzima "in situ" (presente en fracciones de membrana de eritrocitos humanos). El efecto del alcohol sobre la enzima fue evidenciado por este grupo, tanto en un aumento de la V_{max} como en el aumento de la afinidad de la enzima por el Ca^{2+} y por el ATP. Asimismo, el efecto fue observado tanto en la actividad hidrolítica de la enzima como en el transporte de Ca^{2+} asociado. Por otra parte, Benaim y colaboradores en este mismo trabajo, demostraron que la estimulación inducida por el etanol era aditiva a la estimulación inducida por la CaM, lo cual permitió sugerir la existencia de diferentes mecanismos de acción de estos moduladores sobre la bomba de Ca^{2+} así como sugerir que la PMCA podría alcanzar niveles de estimulación superior a los conocidos en presencia de sus moduladores naturales como CaM. Posteriormente, Cervino y colaboradores en 1998, mediante el estudio del efecto del etanol sobre 4 isoformas de la enzima (PMCA1b, PMCA2c, PMCA4a y PMCA4b) y formas truncadas de éstas (PMCA4b $\Delta 44$ y PMCA4b $\Delta 139$), expresadas en células Sf9 a través de un sistema de expresión por baculovirus, demostraron que el etanol ejerce su efecto

sobre la enzima en una región de 95 aa localizada hacia el extremo C-terminal de la proteína. Dado a que esta región de 95 aa, es una región muy extensa para la interacción del etanol con la enzima y en ella se encuentra también el sitio de unión y estimulación por la CaM, nos propusimos como parte de nuestro objetivo en este trabajo, profundizar en la caracterización de esta región de 95 aa en cuanto a su importancia en el efecto estimulador del etanol observado en esta enzima, para tratar de establecer una región más delimitada donde pueda estar interactuando el alcohol. En este sentido construimos y caracterizamos una nueva forma truncada de la PMCA4b (PMCA4b Δ 118).

Como se observa en la figura 15 A, el etanol induce un aumento dosis dependiente de la actividad basal de la Ca²⁺-ATPasa de células COS-7 transfectadas con la isoforma PMCA4b nativa y la forma truncada Δ 44, resultado similar al obtenido por Cervino y colaboradores en 1998 en la enzima expresada a través de baculovirus en membranas de células Sf9. Por su parte y también consecuente con los resultados reportados por Cervino y colaboradores, la actividad Ca²⁺-ATPasa de membranas de células COS-7 transfectadas con la forma truncada Δ 139 no fue estimulada por el etanol (Fig. 15 A, B y C). Estos resultados mantienen lo propuesto por Cervino y colaboradores con respecto a que el etanol interactúa con la bomba de Ca²⁺ en una región comprendida en el segmento de 95 aa C-terminales presentes en la forma truncada Δ 44 de la enzima y ausente en la forma truncada Δ 139 (Fig. 71). Cuando estudiamos el efecto del etanol sobre la nueva forma truncada Δ 118 expresada en este trabajo, observamos un resultado similar al obtenido con la forma truncada Δ 139, indicándonos esto que los 21 aa presentes en la forma truncada Δ 118 y ausente en la Δ 139, no participan directamente en la interacción del alcohol con la enzima. Este resultado es interesante pues nos sugiere, que en los 74 aminoácidos restantes, presentes en la forma truncada Δ 44 y ausentes en la forma truncada Δ 118 pudiera encontrarse la región responsable del efecto estimulador inducido por parte del etanol en la Ca²⁺-ATPasa.

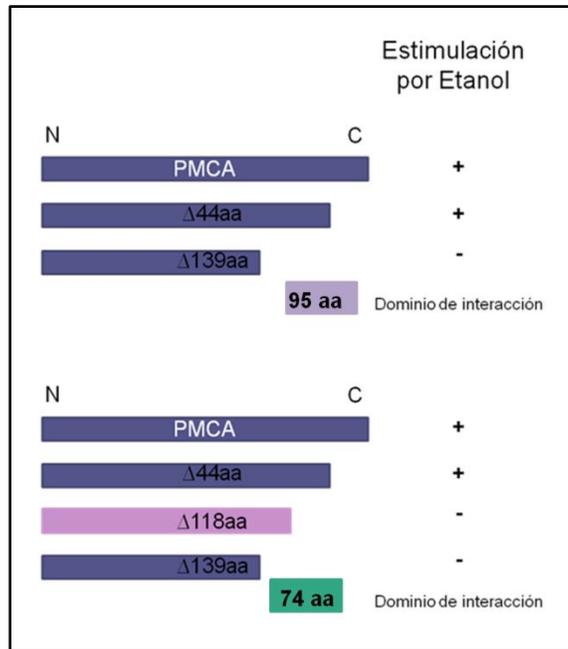


Figura 71. Efecto del etanol sobre las diferentes formas truncadas de la PMCA4b. Modelo esquemático de las regiones donde pudieran estar interactuando el etanol sobre la Ca^{2+} -ATPasa.

Un análisis de la secuencia del fragmento de 74 aminoácidos (Ver figura 17), destaca una alta proporción de aminoácidos polares en este dominio que pueden interactuar con la molécula de etanol. Por otra parte, el carácter hidrofóbico de esta secuencia, determinado mediante el uso de la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (Fig. 18), la cual es altamente empleada para la determinación de dominios citosólico o transmembrana en proteínas, sugiere que este segmento de 74 aa está expuesto hacia el citosol y por ende puede estar disponible para interactuar directamente con el alcohol. Ambos análisis nos permiten corroborar la posible participación de esta región en la interacción del etanol con la enzima. Todos estos resultados nos permitieron acortar la región previamente reportada de 95 aa a una región de 74 aminoácidos, como importante en el modo de acción del etanol con la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática.

Por otra parte, estudiamos en nuestro sistema la aditividad entre el efecto estimulador inducido por el etanol y el efecto estimulador inducido por la CaM sobre la isoforma PMCA4b y las tres formas truncadas Δ44, Δ118 y Δ139 de esta enzima. Tanto en la forma nativa de la enzima como en la forma truncada Δ44, el efecto del etanol fue aditivo al efecto de la CaM, sugiriéndonos esto la existencia de sitios de interacción diferentes para ambos moduladores sobre la enzima. Con respecto a las formas truncadas Δ118 y Δ139 éstas no fueron estimuladas ni por el etanol ni por la CaM. Como

mencionamos anteriormente, estas formas truncadas carecen del dominio de unión a CaM, efecto que puede verse en la actividad basal de las dos formas truncadas las cuales son similares a la actividad basal de la enzima nativa y $\Delta 44$ en presencia de CaM, lo cual explica la falta de estimulación por dicho modulador natural de la enzima. Sin embargo, en estas formas truncadas también se pierde la estimulación por etanol. Al no estar presente el sitio de unión y estimulación por CaM, se podría pensar en una posible participación de esta región en la estimulación de la enzima por el etanol. Sin embargo, si tomamos las evidencias previamente obtenidas por Benaim y col. en 1994, quienes reportaron aditividad del efecto del etanol y la CaM sobre la actividad basal de la Ca^{2+} -ATPasa purificada de eritrocitos humanos, fantasmas de eritrocitos humanos y transporte de Ca^{2+} por vesículas invertidas de eritrocitos. Así como la aditividad del efecto del etanol y la CaM observado sobre la forma nativa y truncada $\Delta 44$ de la enzima expresada tanto en células Sf9 (Cervino y col., 1998) como en las células COS-7 (Ver Fig. 16), podríamos sugerir diferentes mecanismos de acción para estos moduladores sobre la enzima. Esta conclusión aunada a los trabajos realizados por Verma y colaboradores en 1994 donde mediante el uso de dos formas truncadas de la PMCA ($\Delta 92$ y $\Delta 120$) lograron determinar que el dominio de interacción de la CaM con la enzima es una región de 28 aa, ubicada en la región de 74 aa C-terminal que hemos establecido como posible sitio de interacción del etanol con la enzima (ver región marcada con letra cursiva en la Fig. 12). Podríamos plantear entonces, como se observa en el esquema mostrado en la figura 72, que al restar de la región de 74 aa C-terminales, los 28 aminoácidos donde ejerce su efecto la CaM, quedarían 46 aminoácidos responsables del efecto del etanol con la enzima. Los resultados mostrados nos permiten entonces proponer esta región de 46 aminoácidos como el posible sitio de modulación por parte del EtOH sobre la isoforma PMCA 4b.

Quedaría a futuro tratar de establecer dentro de esta región, el o los aminoácidos donde estaría interactuando directamente el etanol con la enzima. Esta suposición podría ser fácilmente corroborada con la generación de nuevas formas truncadas de la enzima siendo éste uno de los objetivos a futuro de nuestra investigación. Asimismo, para poder concluir con certeza sobre el sitio exacto de interacción del alcohol serían también necesarios estudios de interacción del etanol o compuestos sintéticos marcados directamente con la enzima.

Ca²⁺-ATPasa a su potencial de actividad máxima. Debido a esto, surgió la importancia de tratar de encontrar un efector o efectores naturales que simulen el efecto inducido por el etanol. En este sentido, nuestro laboratorio ha orientado sus estudios a la búsqueda de posibles moduladores endógenos que posean grupos "hidroxilo" libres en su estructura, ya que evidencias previas obtenidas por Benaim y De Meis en 1989, quienes estudiaron el efecto de polialcoholes sobre la Ca²⁺-ATPasa; Benaim y colaboradores en 1994, quienes estudiaron el efecto de diferentes alcoholes de cadena corta sobre la actividad de la enzima y Suju y colaboradores en 1996 quienes estudiaron el efecto de fosfatidilalcoholes sobre la misma proteína, habían planteado que si bien podría haber alguna participación de la cadena hidrocarbonada en el efecto del etanol observado, el grupo hidroxilo libre de esta alcohol pareciera ser el responsable de la modulación observada.

A raíz de estos hallazgos, en nuestro laboratorio comenzamos la búsqueda de moléculas, particularmente lípidos que tuviesen un grupo "hidroxilo" libre en su región polar, con el objeto de dilucidar si dicho grupo, era fisiológicamente importantes y responsable de la activación que produce el etanol. En este sentido, Colina y colaboradores en el 2002 y posteriormente Pérez-Gordones y colaboradores en el 2009, estudiaron el efecto de conocidos segundos mensajeros de origen lipídico sobre la actividad de la enzima. Por su parte Colina y colaboradores propusieron que el grupo "OH" es de extrema importancia para la estimulación de la enzima, ya que la ceramida, importante segundo mensajero involucrado en procesos de proliferación celular, es capaz de estimular a la Ca²⁺-ATPasa, mientras que la esfingosina, segundo mensajero involucrado en procesos de muerte celular y apoptosis, la inhibe. La importancia del grupo "OH" se demuestra en ese trabajo cuando el mismo es sustituido mediante fosforilación en los compuestos ceramida-1-P y esfingosina-1-P, perdiéndose así la capacidad de modular a la enzima (Colina y col. 2002).

Por otra parte, Pérez-Gordones y Colaboradores en el 2009, demuestran que el DAG, el cual también presenta en su estructura un grupo "OH" libre, es capaz de estimular directamente a la bomba de Ca²⁺ de membrana plasmática, aparte de su estimulación indirecta vía activación de la proteína quinasa C (PKC) (Lee y Severson, 1994; Nishizuka, 1995, Ganong y col., 1986). En este trabajo, los investigadores demostraron mediante diferentes aproximaciones fluorescentes, que el DAG se une directamente a la enzima, a pesar de que ésta carece de los dominios clásicos C1 y C2

de interacción con DAG que están presentes en todas las proteínas blancos del DAG (Yang y Kazanientz, 2003 y Brose y col., 2004).

Si bien todos los moduladores lipídicos estudiados en el laboratorio, presentan aditividad con el etanol, hecho que permite sugerir que ninguno de ellos es capaz de suplir fisiológicamente el efecto del alcohol, estos estudios fueron de gran importancia pues permitieron conocer nuevos moduladores fisiológicos de la Ca^{2+} -ATPasa, aumentando de esta manera la complejidad de la modulación y regulación “*in vivo*” de esta enzima. En este trabajo y con ayuda de las formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ expresadas de la PMCA, nos propusimos como objetivo adicional tratar de profundizar y establecer la región de interacción y posible mecanismo de acción de la ceramida y DAG sobre la PMCA.

Como se puede observar en las figuras 19 y 21 tanto el DAG como la ceramida son capaces de estimular tanto a la isoforma nativa PMCA4b como a las formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ de manera independiente de que estas formas truncadas sean sensibles o no a CaM y etanol. Estos resultados sugieren que los 139 aa presentes hacia el extremo C-terminal de la isoforma PMCA4b, estudiados con ayuda de las formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$, no parecieran estar involucrados en la interacción de estos moduladores con la enzima.

La estimulación de las diferentes isoformas de PMCA por parte de fosfolípidos ácidos es bien conocida (Niggli y col., 1981, Papp y col., 1989, Lehotsky y col., 1992 y Enyedi y col., 1993). Estudios en donde se caracterizan fragmentos de la bomba obtenidos bajo proteólisis controlada de la enzima con tripsina, permitieron localizar un primer dominio responsable de la sensibilidad de la enzima a los fosfolípidos. Este dominio formado por 44 aa y no presente en el resto de las ATPsas tipo P está ubicado en el primer loop citoplasmático de la enzima (región N-Terminal) entre los dominios transmembrana M2 y M3 y conocido como dominio A_L (Zvaritch y col., 1990 y Tezanos Pinto y Adamo., 2002). Por otra parte, trabajos en los que se utilizaron péptidos sintéticos con la secuencia del sitio de unión de fosfolípidos propuesto por Zvaritch y la secuencia de unión a CaM permitieron demostrar la presencia de un segundo dominio de unión de lípidos en la enzima, este último presente en el dominio de unión a CaM.

Observando los resultados obtenidos en este trabajo (Figs.19, 20 21, 22 y 23) podemos proponer que tanto el DAG como la ceramida posiblemente interactúen con la

enzima en el dominio de 44 aa propuesto por Zvaritch y colaboradores, ya que no hay diferencia alguna entre el efecto inducido por estos moduladores en las diferentes formas truncadas utilizadas en este trabajo. Indicando de esta manera que el segundo sitio de unión a fosfolípidos ubicado en el tercer dominio citosólico de la enzima hacia el extremo C-Terminal no está contribuyendo con el efecto estimulador inducido por el DAG y la Ceramida, como puede deducirse al observar sus efectos sobre la actividad de las diferentes formas truncadas de la enzima. Para tratar de esclarecer si tanto el DAG como la Ceramida interactúan sobre la enzima en la misma región de interacción N-terminal de los fosfolípidos ácidos previamente reportada, estudiamos el efecto de ambos moduladores de manera independiente, así como simultáneamente con la fosfatidilserina (PS) sobre la Ca^{2+} -ATPasa purificada de eritrocitos humanos. Como se puede observar en la figura 23 no hay aditividad entre los efectos de PS-DAG, PS-Ceramida, DAG-Ceramida y DAG-PS-Ceramida. Este resultado sugiere que estos tres moduladores lipídicos posiblemente interactúan con la enzima en un mismo dominio. Por su parte, la aditividad observada entre DAG-CaM y Ceramida-CaM (Fig. 20C y D, 22C y D), permite sugerir que la presencia de la CaM no interfiere en la modulación por parte de estos lípidos y viceversa. Es decir, si parte del efecto inducido por el DAG y la Ceramida sobre la V_{\max} de la enzima se debiera a que éstos interactúan con la enzima en los dos dominios de unión a lípidos propuestos, la presencia simultánea del DAG y la Ceramida con la CaM, arrojarían valores de V_{\max} inferiores a los mostrados, debido a la competencia entre éstos por el dominio de unión a CaM en el extremo C-terminal. Nuestros resultados apoyan el modelo propuesto por Tezanos Pinto y Adamo en el 2002, donde proponen que la activación de la PMCA por los lípidos en la región A_L no modifica la interacción inhibitoria del extremo C terminal de la enzima con su región receptora presente en el segundo dominio citosólico de la enzima entre los aa 537 y 544.

En concordancia con el grupo de Adamo nuestros resultados nos permite apoyar su modelo en donde se propone que aparte de los tres posibles estados funcionales sugeridos para la Ca^{2+} -ATPasa (Enyedi y col., 1987 y Papp y col., 1989), los cuales son: El estado de reposo con una V_{\max} y afinidad por Ca^{2+} baja ($K_{0.5} > 1\mu\text{M}$); un estado activado por CaM con una V_{\max} alta y una afinidad por Ca^{2+} media ($K_{0.5} \sim 0.5\mu\text{M}$) y un estado de activación por lípidos ácidos con una alta V_{\max} y afinidad por Ca^{2+} ($K_{0.5} \sim 0.2\mu\text{M}$), puede existir un cuarto estado en donde la interacción de los lípidos ácidos o en nuestro caso del DAG y la Ceramida presentes en la membrana, con la región A_L de la PMCA induce

que ésta adopte un estado de V_{max} baja o intermedia y una afinidad por Ca^{2+} intermedia o alta (Tezanos y Adamo 2002).

Este modelo propone que dado a la posible mayor afinidad de los lípidos ácidos por la región A_L con respecto a la región de unión de lípidos presente en el extremo C-terminal de la enzima (Choquette y col., 1984; Filoteo y col., 1992; Brodin y col., 1992, Tezano y Adamo 2002), se podría especular que bajo condiciones basales o de reposo cuando la $[Ca^{2+}]_i$ libre decrece hasta el punto que la activación CaM- Ca^{2+} es insignificante, los lípidos unidos a la PMCA la mantienen en un estado de activación de “alerta”, en el caso de requerir su activación tras una señal inducida por algún agonista. Este modelo del grupo de Adamo sugiere que en ausencia de lípidos en la región A_L la PMCA está en un estado de baja afinidad por Ca^{2+} proponiendo así que aparte del muy caracterizado dominio autoinhibitorio de CaM existe también un dominio autoinhibitorio de unión a la membrana.

Se podría sugerir entonces que el DAG y la Ceramida en nuestro caso estarían interactuando con dicha región N-terminal simulando el efecto de la PS y otros fosfolípidos ácidos previamente reportados, por lo que tomando en conjunto todos los resultados, nos permitimos sugerir un mecanismo de acción similar del DAG, la Ceramida y la fosfatidilserina sobre la enzima.

5.2. Caracterización fisiológica, molecular, inmunológica y bioquímica de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*

El Ca^{2+} juega un papel crucial en la regulación de una gran cantidad de procesos celulares en los Tripanosomatidios (Docampo y Moreno 2003). Actualmente, la mayoría de los sistemas que participan en la homeostasis de Ca^{2+} en eucariotas superiores, ya han sido evidenciados en los Tripanosomatidios. Casi en su totalidad, estos estudios han sido realizados en *T. cruzi* y *T. brucei* y *Leishmania*, gracias a la severidad de las enfermedades causadas por estos en humanos. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la regulación del Ca^{2+} en miembros de esta familia que afectan animales domésticos, los cuales generan grandes pérdidas económicas en el sector agrario.

Mendoza y colaboradores en el 2002, 2004 y 2008, fueron pioneros en evaluar los procesos de homeostasis de Ca^{2+} en *T. evansi*, evidenciando mediante métodos

fisiológicos la presencia de reservorios de Ca^{2+} a nivel de mitocondria, RE y acidocalcisoma, los cuales presentan características similares a sus homólogos en eucariotas superiores. Este parásito ha sido sugerido como modelo ideal para el estudio de los procesos involucrados en la regulación de Ca^{2+} en los Tripanosomatidios, gracias a su homogeneidad dentro de la población, su tamaño (15 – 34 μm , Soulsby, 1987), facilidad de obtención y no ser patógeno para humanos (Mendoza y col., 2001). Dado a la poca información existente sobre los mecanismos involucrados en la homeostasis de Ca^{2+} en *T. evansi*, en esta parte de nuestro trabajo, nos propusimos como objetivo la identificación mediante una aproximación fisiológica, inmunológica y molecular de las principales proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *T. evansi*, con la finalidad de caracterizar y establecer diferencias o similitudes con sus homólogos en eucariotas superiores.

5.2.1. Evidencias fisiológicas de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*

Los resultados fisiológicos obtenidos mediante la evaluación de los mecanismos involucrados en la homeostasis de Ca^{2+} por espectrofluorimetría en parásitos cargados con FURA-2AM, permitieron evidenciar la presencia de una bomba de Ca^{2+} tipo SERCA sensible a Tg y BHQ, de canales de Ca^{2+} similares a los descritos en eucariotas superiores como canales tipo SOC y de otras proteínas involucradas en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, posiblemente Ca^{2+} -ATPasas de tipo PMCA y vacuolar, las cuales han sido descritas en diferentes Tripanosomatidios (Benaim y col., 1995, Lu y col., 1998, Furuya y col., 2001).

El RE de los Tripanosomatidios, actúa como reservorio intracelular de Ca^{2+} , gracias a la presencia de una SERCA (Docampo, 1993). Se ha descrito que esta enzima es inhibida por bajas concentraciones de Tg (1 μM) en *T. brucei*, (Ruben y col., Stojdj y Clarke, 1996), al igual que en eucariotas superiores, mientras que *T. cruzi* y *Leishmania* resultan insensibles a esta misma concentración de Tg (Lu y col., 1997; Furuya y col., 2001). Tan solo se produce un efecto a altas concentraciones del inhibidor, lo cual produce el desacoplamiento del potencial de membrana a nivel de la mitocondria (Vercesi y col., 1993). Esta controversia plantea la posibilidad de diferencias estructurales entre las diferentes SERCAs reportadas en los Tripanosomatidios. Sin embargo, existen pocos estudios dedicados a la caracterización de este transportador y menos aun sobre el efecto de otros inhibidores, como el ácido ciclopiazónico (CPA) (Lu y col., 1997, Stojdj y

Clarke, 1996) y la butilhidroquinona (BHQ). Dado a la falta de información en el tema, en esta parte del trabajo nos propusimos profundizar en el estudio del efecto de la Tg y otros inhibidores sobre la homeostasis del Ca^{2+} en *T. evansi*, para poder contribuir a la caracterización de este transportador en los Tripanosomatidios.

Como se pudo observar, nuestros resultados demuestran la presencia de un reservorio intracelular de Ca^{2+} sensible a bajas concentraciones de Tg (1 μM) en *T. evansi*. Efecto similar al descrito en este mismo parásito (Mendoza y col 2004), en *T. brucei* (Nolan y col., 1994 y Stojdj y Clarke, 1996) y en eucariotas superiores (Inesi y col., 2005). Igualmente, el BHQ (25 μM), induce un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en *T. evansi*, mientras que el CPA, inhibidor que induce la liberación de Ca^{2+} en *T. brucei* (Stojdj y Clarke en 1996) y en *T. cruzi* (Furuya y col., 2001), fue incapaz de inducir un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en *T. evansi*. Estos resultados sugieren diferencias a nivel estructurales entre la SERCA de *T. evansi* y de eucariotas superiores, así como con las SERCAs descritas en otros Tripanosomatidios.

En eucariotas superiores, el efecto de la Tg y el BHQ son excluyentes entre sí (Llopis y col., 1991) a pesar que se conoce que su interacción con la enzima no ocurre en el mismo sitio (Obara y col., 2005), por lo tanto no participan los mismos residuos aminoacídicos. Es decir, estos inhibidores actúan sobre el mismo reservorio pero sus efectos no son aditivos. Nuestros resultados (Fig. 25) nos sugiere de manera similar que ambos inhibidores están actuando sobre el mismo reservorio, ya que la adición de uno despiden del otro compromete el efecto del segundo. Sin embargo, a la concentración de BHQ utilizada para inhibir el efecto de la Tg, la adición de BHQ (Fig. 25B) posterior a la Tg produce un pequeño incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sugiriendo que a esta concentración, el BHQ podría actuar no solo sobre SERCA, sino inespecíficamente sobre otro mecanismo involucrado en la homeostasis de Ca^{2+} .

Por otra parte, el efecto de los inhibidores de SERCA en eucariotas superiores, está asociado a la entrada capacitativa de Ca^{2+} , mediante un mecanismo conocido como entrada de Ca^{2+} activada por vaciado de reservorios (SOC, de sus siglas en ingles) (Lievremont y col., 2005; Putney., 2007). Como pudimos apreciar en nuestros resultados, se produce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular como producto del efecto de Tg y BHQ sobre *T. evansi* (Fig. 24 A y B). Con la finalidad de explorar el mecanismo de transporte involucrado, se evaluó el efecto del 2-aminoetoxydifencil borato (2-APB), un conocido inhibidor de canales de Ca^{2+} tipo SOC (Chang., 2006). Nuestros resultados muestran que el 2APB (50 μM) disminuye

notablemente este efecto (Fig. 26A y B). De la misma manera, la adición de 2APB posterior al efecto de la Tg o BHQ en presencia de Ca^{2+} , produce un cambio drástico en la pendiente del trazo, lo cual posiblemente implica la inhibición de la entrada de Ca^{2+} (fig. 26 B y D). Estos resultados nos permiten evidenciar la posible presencia de un canal de Ca^{2+} tipo SOC en *T. evansi*, siendo la primera vez que se reporta un canal de este tipo en un Tripanosomatidio. Dado a que este tipo de canales son los responsables en gran medida de la entrada de Ca^{2+} en células eucarióticas no excitables, donde se creen ausentes canales voltajes dependientes (Chang, 2006) y dado a que los mismos han sido evidenciados en eucariotas inferiores como levaduras y gusanos (Potier y Tebak, 2008) no es irrisorio pensar que estos puedan estar presentes en Tripanosomatidios.

Adicionalmente, se puede observar en nuestros resultados que tras la modulación inducida por los inhibidores Tg y BHQ, se produce una entrada de Ca^{2+} , la cual decae con el tiempo (Figura 24A y B y 25A y B). Esto sugiere la presencia de otras proteínas involucradas en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en este parásito, las cuales han sido previamente descritas en otros Tripanosomatidios, tal como las Ca^{2+} -ATPasa a nivel de la membrana plasmática (PMCA) o de los acidocalisomas (Vacuolar- Ca^{2+} -ATPasa) entre otras (Benaim y Romero 1990, Benaim y col., 1991, Benaim y col 1993a y Docampo y Moreno, 1999).

Con el propósito de profundizar en el estudio de las proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *T. evansi*, nos propusimos evidenciar su presencia en el genoma de *T. evansi* y así inferir su estructura primaria y secundaria. De esta manera, podemos establecer las posibles diferencias entre éstas, las descritas en otros Tripanosomatidios y en eucariotas superiores, las cuales pueden estar involucradas en la diferencias de sensibilizada a los inhibidores y moduladores que se han reportado.

5.2.2. Evidencias moleculares de la presencia de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi* (Identificación molecular de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*)

Partiendo de las proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} descritas en *T. brucei* y apoyándonos en la alta homología que comparte estos parásito, procedimos a obtener las secuencias nucleotídica correspondientes en *T. evansi*. Como se muestran en los resultados logramos obtener las secuencias completas para 4 proteínas, los programas de búsqueda de homología empleados las sugieren como las posibles Ca^{2+} -ATPasa: tipo PMCA (I- VCa^{2+} -ATPasa), tipo vacuolar (II- VCa^{2+} -ATPasa), y tipo SERCA (III-

VCa²⁺-ATPasa), así como la posible subunidad α de un putativo canal de Ca²⁺, en base a la secuencias para los dominios identificados en cada una, los cuales las caracterizan (Fig. 35, 44, 53 y 62).

5.2.3. Caracterización de la posible Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA en *Trypanosoma evansi*

Logramos evidenciar la presencia de una posible Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA en *T. evansi*. Esta presenta una secuencia de 1080 residuos aminoacídicos prediciéndosele un PM aparente de 118.9 KDa y contentiva de 10 posibles dominios TM, donde aproximadamente el 80% de la misma queda expuesta hacia la cara citosólica del parásito. El análisis de esta secuencia mediante un Clúster, donde se comparó con proteínas similares descritas en otros tripanosomatidios y con la PMCA 4b de humanos (Tabla 11 y 12) nos arrojó un porcentaje de homología del 99% con la secuencia de *T. brucei*, 61% con la de *T. cruzi*, 58% con la *Leishmania major*, y un 34% con la de *Homo sapiens*. Por otra parte, la secuencia obtenida presenta los dominios conservados para las ATPasas de Ca²⁺ como son: el dominio de fosforilación, los dominios de unión a nucleótidos y los dominios de unión a Ca²⁺.

Por otra parte, los programas utilizados para la búsqueda de dominios conservados no reportaron ningún dominio clásico de unión a CaM, hecho que apoya los resultados de Luo y colaboradores en el 2004, en donde caracterizan una Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA, la cual colocaliza a nivel de membrana plasmática pero carece del dominio característico de este tipo enzima, el dominio de unión a CaM. Sin embargo, los trabajos realizados por el grupo de Benaim y colaboradores, describen una actividad Ca²⁺-ATPasa, estimulada por la CaM en vesículas de membrana plasmática de *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* (Benaim y col., 1991, 1993a y 1993b). Estos resultados nos sugirieron realizar una búsqueda más detallada sobre la secuencia obtenida, para ello utilizamos el programa "**Calmodulin target Database**", el cual nos sugirió la presencia de un dominio no clásico de alta confianza de unión a CaM, situado en el extremo C-terminal de la proteína, el cual alinea con el dominio clásico de unión a CaM en la PMCA 4b (Fig. 34). Adicionalmente, el hecho que la longitud entre la secuencia del dominio de unión no clásica de CaM, con el posible dominio receptor de éste presente en la región catalítica de la enzima en *T. evansi* (Fig. 35 color verde oscuro), sea muy similar a la longitud entre estos 2 dominios en PMCA 4b, sugiere la posibilidad del mismo mecanismo autoinhibitorio de CaM en este parásito.

Apoyando estos resultados tenemos: el aumento de la actividad Ca^{2+} -ATPasa basal en presencia de CaM, en las vesículas de membrana plasmática de *T. evansi* (Fig. 68), el reconocimiento de una banda de aproximadamente 120 KDa por parte de CaM-biotinilada en el extracto de proteínas de estas vesículas (Fig. 69), su purificación mediante cromatográfica de afinidad con una columna CaM-Sefarosa (Fig. 70), el reconocimiento de una banda de masa molecular similar a la reportada por parte del anticuerpo monoclonal 5F10 (Fig. 65) y la consecuente inmunoprecipitación de dicha banda (Fig. 67). En conjunto, nuestro trabajo sugieren la presencia de una PMCA modulada por CaM en *T. evansi*, la cual presenta una topología similar a la PMCA descritas en eucariotas superiores (Fig. 36). Extrapolando estos resultados a otros tripanosomatidios, podemos sugerir que las PMCA reportadas en *T. cruzi*. (Furuya y col., 2001) y *T. brucei* (Luo y col., 2004), las cuales carecen de dominio clásico de unión a CaM posean un dominio no clásico de unión a la proteína. Por lo tanto, se plantea la posibilidad de profundizar en el estudio de estas y revisar su clasificación como PMCA o vacuolar.

5.2.4. Caracterización de la posible Ca^{2+} -ATPasa tipo vacuolar en *Trypanosoma evansi*.

Una vez caracterizada la primera secuencia procedimos a realizar los mismos análisis con la II-VCa²⁺-ATPasa. La búsqueda de similitud o Blast, sugiere que esta secuencia se asemeja a una Ca²⁺-ATPasas vacuolar (Tablas 14 y 15). Esta presenta una secuencia de 1090 aminoácidos con un PM aparente de 119.5 KDa y al igual que en el caso anterior posee 10 dominios TM, mostrando el 80% de su superficie hacia el extremo citosólico del parásito.

Por otra parte, el análisis por clúster de las secuencias (tabla 15) muestra un 99% de homología con la secuencia reportada para la Ca²⁺-ATPasas vacuolar de *T. brucei*, la cual fue caracterizada por Luo y colaboradores 2004. Estos autores demostraron su colocación con una H⁺-ATP-asa a nivel de los acidocalsisomas, lo cual nos permite sugerir que la II-VCa²⁺-ATPasa de *T. evansi* es la enzima encargada de acumular Ca²⁺ en estos organelos ácidos. La presencia de una Ca²⁺-ATPasa en los acidocalsisomas en *T. evansi*, fue evidenciada tanto en estudios realizados por microespectrofluorometría en parásitos enteros (Mendoza y col 2004), como mediante el estudio del transporte de Ca²⁺ con isótopos marcados radiactivamente en acidocalsisomas purificados (resultados no publicados).

Al igual que la I-VCa²⁺, la II-VCa²⁺-ATPasa no presentó un dominio clásico de unión a CaM, pero a diferencia de la primera, lo característico y resaltante es que el análisis mediante el programa “**Calmodulin target Database**”, tampoco encontró ningún dominio no clásico de unión a CaM en el extremo C- terminal de la segunda. Este resultado corrobora la posibilidad de que la II-VCa²⁺-ATPasa corresponda a una Ca²⁺-ATPasa vacuolar en *T. evansi*.

5.2.5. Caracterización de la posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA en *Trypanosoma evansi*.

El análisis de la secuencia III-VCa²⁺-ATPasa nos indicó la presencia de una posible Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA, la cual presenta 1010 residuos aminoacídicos, con un PM esperado de 110 KDa. El análisis de homología o BLAST (tabla 17 y 18) compararon esta secuencia mediante el alineamiento de las SERCAs descritas en otros tripanosomatidios, arrojando un porcentaje de homología del 99% con la SERCA de *T. brucei* (Nolan y col. 1994), 76% con *T. cruzi*, 65% con *Leishmania major* y un 48% con SERCA 1 de *Homo sapiens* (tabla 18).

La búsqueda de dominios conservados sobre la secuencia (Fig. 50), permitió identificar sobre esta proteína un dominio de unión de nucleótido, el dominio de fosforilación, así como los 10 posibles dominios TM, característicos de esta familia de ATPasas. Adicionalmente, fueron identificados los residuos que le confieren a la enzima su alta afinidad por Ca²⁺ (E³¹⁵, E⁷⁷⁰, N⁷⁹⁵, T⁷⁹⁸, D⁷⁹⁹ y E⁹⁰⁰), los cuales están presentes en los dominios M4, M5, M6 y M8 respectivamente y han sido descritos en las SERCAs de *T. cruzi* (Furuya y col., 2001) y *Leishmania* (Lu y col., 1997). Estos resultados nos permitieron sugerir a la III-VCa²⁺-ATPasa como una posible SERCA en *T. evansi* y proponer un modelo topológico similar al de la proteína en eucariotas superiores (Fig. 54).

La falta de un dominio de unión a CaM en las Ca²⁺-ATPasas tipo SERCA, es una característica distintiva, que utilizan diversos autores para clasificar a las Ca²⁺-ATPasas como SERCA o como PMCA, tanto en eucariotas superiores como en los Tripanosomatidios (Brini y Carafoli, 2009; Lu y col., 1997; Furuya y col., 2001 y Nolan y col., 1994). Por tal motivo, la falta de un dominio tanto “clásico” como “no clásico” de unión a CaM (análisis realizado con el programa (“**Calmodulin Target Database**”) en el extremo C-terminal, nos permite sugerir que esta secuencia corresponde a una posible

Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA y podemos proponer un modelo topológico similar al de SERCAs de eucariotas superiores (Fig. 54).

Otra característica fundamental que define a las Ca²⁺-ATPasas de retículo endo (sarco) plasmático en eucariotas superiores, es su sensibilidad a la Tg (Inesi, 2005). En los diferentes tripanosomatidios estudiados, la sensibilidad a la Tg ha generado la controversia ya descrita. Actualmente, gracias al análisis de cristales de esta enzima, mediante la técnica de difracción de rayos X (Toyoshima y Mizutani, 2002), se ha establecido que la Tg se une a la enzima en una cavidad constituida por los dominios M3, M5 y M7, donde la unión de este inhibidor a la enzima es estabilizado mediante la formación de un puente de hidrógeno entre residuo I⁸²⁹ y el O⁸ de la Tg (Toyoshima y Mizutani, 2002). Por otra parte, se ha sugerido que también están involucrados los residuos: F²⁵⁶, Q²⁵⁹ en el dominio M3, la I⁷⁶¹ en M5 y la F⁸³⁴ en M7, los cuales son esenciales para la estabilización de la unión del inhibidor y la enzima (Norregaard y col., 1994, Guerini y col., 2002, Moncoq y col., 2007 Laursen y col., 2009).

La mayoría de estos residuos están conservados tanto en la secuencia III-V-Ca²⁺-ATPasa y en las secuencias de los diferentes tripanosomatidios empleados en el alineamiento realizado (Fig. 53). Observándose, tan solo una única sustitución conservada en la I⁸²⁹ de SERCA de eucariotas superiores por una V en las SERCAs de los diferentes Tripanosomatidios alienados (V⁸²⁸ en *T. evansi*, V⁸²⁸ en *T. brucei*, V⁸²³ en *T. cruzi* y V⁸³⁰ en *Leishmania major*). Dado a que esta variación está presente en todos los Tripanosomatidios alineados y que tanto *T. evansi* como *T. brucei* son sensibles al inhibidor, dicha sustitución no debe afectar la unión de la Tg a la enzima.

Lu y colaboradores en 1997, sugieren que la insensibilidad de SERCA a la Tg caracterizada en *Leishmania*, se debe a la presencia de dos sustituciones aminoacídicas a nivel del dominio M3. Específicamente, ellos sugieren que la sustitución de la G²⁷¹ y la F²⁷⁹ en *Leishmania* por una K y V respectivamente en la SERCA de *T. brucei*, así como en las isoforma 1 y 2 de SERCA de eucariotas superiores, son las responsables de la insensibilidad que presenta esta enzima al inhibidor. Los autores proponen que la cadena lateral básica de la K, así como la cadena alifática de la V, son importantes para la estabilidad de la unión del inhibidor. Sin embargo, con base en los modelos cristalizados de SERCA con Tg, estos aminoácido no parecen intervenir en dicha estabilidad (Toyoshima y Mizutani, 2002, Laursen y col., 2009). Por otra parte, Furuya y colaboradores en el 2001, proponen que la insensibilidad de SERCA de *T. cruzi* a Tg, se

debe a la sustitución de la T²⁶⁶ de la isoforma 3 de SERCA de eucariotas superiores por una I en *T. cruzi* y *Leishmania*. Pero esta T²⁶⁶ también está sustituida por una I en la isoforma 1 de SERCA (eucariotas superiores), la cual también es sensible a Tg, desestimando esta aproximación.

El CPA, por su parte, ejerce su efecto inhibitorio sobre SERCA uniéndose a la enzima en un bolsillo que involucra los dominios M1, M2, M3 y M4. La unión del inhibidor a la enzima es estabilizada mediante la formación de 2 puentes de H entre los residuos N¹⁰¹ y D²⁵⁴ con los C⁹ y C² del CPA respectivamente (Laursen y col., 2009). Los residuos Q⁵⁶ y D⁵⁹ en M1, N¹⁰¹ en M2 y D²⁵⁴ en M3, también participan en la estabilización de la unión del CPA a la enzima. Todos estos residuos están presentes en la secuencia III-VCa²⁺-ATPasa de *T. evansi*. Sin embargo, a diferencia de los resultados observados en *T. brucei* por Stojdl y Clarke en 1996, en *T. evansi* no se produjo un incremento en la [Ca²⁺]_i tras la adición del CPA.

Recientemente, se ha estudiado la participación del Mg²⁺ en la unión del CPA a SERCA, proponiéndose que la unión del inhibidor a SERCA es dependiente de la presencia de Mg²⁺ (Momtigny y col., 2007). Dado a que este inhibidor se comporta como un quelante de iones metálicos (Laursen y col., 2009), es probable que la concentración real del catión utilizada en nuestros experimentos (medio tyrode 2mM Mg²⁺) fuese menor a la esperada y por tanto no se observó el efecto esperado por parte del CPA.

Por su parte, el BHQ, otro conocido inhibidor clásico de SERCA y el cual fue capaz de inducir un aumento en la [Ca²⁺]_i de *T. evansi*, interactúa con la enzima en un bolsillo que involucra los dominios M1 y M4, estabilizándose la unión entre éste y la enzima a través de 2 puentes de H entre los residuos D⁵⁹ y P³⁰⁸ de la enzima con cada uno de los grupos "OH" del BHQ (Moncoq y col., 2007, Laursen y col., 2009). Los residuos D⁵⁹, L⁶¹, V⁶², L⁶⁵ en M1 y P³⁰⁸, E³⁰⁹ y P³¹² en M4 también participan en la estabilización del inhibidor (Obara y col., 2005, Laursen y col., 2004). Todos ellos, al igual que en los casos anteriores están presentes en la III-VCa²⁺-ATPasa de *T. evansi*, al igual que en todas las secuencias utilizadas en el alineamiento (Fig.53). En la revisión que se realizó en la literatura no se encontró información sobre el efecto de este inhibidor sobre la [Ca²⁺]_i de ningún tripanosomatidio. Por lo tanto, resulta interesante profundizar en el estudio de este inhibidor sobre otros miembros de esta familia, para ver si su efecto es selectivo o específico entre ellos y así poder emplearlo como herramienta de estudio en la homeostasis del Ca²⁺ en los tripanosomatidios.

Las evidencias inmunológicas obtenidas mediante la utilización del anticuerpo H300, confirman la presencia de una Ca^{2+} -ATPasa de tipo SERCA en *T. evansi*, tanto mediante el reconocimiento de una única banda proteica de PM cercano a 100 KDa por inmunotinción, como por la obtención de una proteína de tamaño similar por inmunoprecipitación (Fig. 67). Adicionalmente, este anticuerpo permitió localizar a su antígeno blanco a nivel del RE, mediante la colocalización con el marcador Bodipy (Fig. 66 -1), este resultado corrobora la unión de Tg a la enzima en el RE.

Adicionalmente, el servidor Phyre 2 predijo una estructura terciaria con un 99% de confianza similar a la de la SERCA de músculo esquelético de conejo obtenido por difracción de rayos X para la secuencia aminoacídica de la III- VCa^{2+} -ATPasa de *T. evansi* (Olesen y col., 2007). Por lo tanto, es posible que la controversia con respecto a la sensibilidad de las SERCAs reportadas en diferentes tripanosomatidios no se deba a 1 o 2 cambios aminoacídicos puntuales en las regiones adyacentes a los sitios de interacción de los diferentes inhibidores, sino más bien, a la suma de varias sustituciones que de alguna manera, a pesar de no estar directamente involucradas en el contacto con el inhibidor, generen cambios conformacionales que impidan el correcto acomodo del inhibidor.

5.2.6. Caracterización del posible canal putativo de Ca^{2+} en *Trypanosoma evansi*

El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como consecuencia de la adición de Tg y BHQ en presencia de Ca^{2+} extracelular en *T. evansi*, sugieren la presencia de un canal de Ca^{2+} en estos parásitos cuyo mecanismo es similar al descrito en eucariotas superiores, donde el vaciado del reservorio induce la entrada de Ca^{2+} (Lievremont, 2005, Putney., 2007). Este resultado es corroborado por el efecto inhibitor del 2APB, sobre la entrada de Ca^{2+} producida por la Tg y el BHQ. Adicionalmente, al realizar una búsqueda en el subproteoma de membrana plasmática descrito para *T. brucei* (Bridges y col., 2008), encontramos la presencia de una única secuencia clasificada como un canal putativo de Ca^{2+} , la cual presenta una homología del 99 % con la obtenida por nosotros en *T. evansi*. Esta secuencia contentiva de 2693 residuos aminoacídicos con PM aparente de 303.8 KDa, presento homologías con la subunidad α A1 de un canal de Ca^{2+} voltaje dependiente de *Homo sapiens*.

El análisis de la secuencia nos permitió establecer un modelo topológico (Fig. 63) similar a los reportados para la subunidad α de varias familias de canales de Ca^{2+} voltaje

dependientes. En el modelo se destacan 4 dominios translocadores de Ca^{2+} , cada uno contenido de 6 dominios TM y un dominio P, los cuales, en conjunto conforman el poro del canal (Fig. 63), donde se encuentra el filtro de selección.

En eucariotas superiores el filtro de selección está establecido como un residuo E. (Benoff y col., 2007). En cambio, en la secuencia obtenida en *T. evansi*, las subunidad α descritas presentan en el filtro de selectividad del catión del putativo canal, los siguientes residuos de selectividad QESE. Estas sustituciones ciertamente comprometen la selectividad del catión a translocar. Sin embargo, existen trabajos donde se han reportado cambios aminoacídicos en el filtro de selectividad, por ejemplo del canal de Na^+ , cuyo motivo de selectividad es DEKA. La sustitución de los residuos K y A generan mutantes con la capacidad de translocar Na^+ y Ca^{2+} (Lipkind y Fozzard, 2001). Por tal motivo, existe la posibilidad de que el canal encontrado en *T. evansi*, bien permita el paso de varios iones, o simplemente sea un canal de Ca^{2+} con una afinidad inferior a la de sus homólogos en eucariotas superiores. Para corroborar esta hipótesis se hace necesario profundizar en la caracterización de este posible canal, siendo éste uno de nuestros objetivos futuros.

Las evidencias inmunológicas obtenidas mediante la utilización del anticuerpo H280, confirman la presencia de un putativo canal de Ca^{2+} en *T. evansi*, tanto mediante el reconocimiento de una única banda proteica en la fracción de membrana de PM cercano al esperado (Fig. 65), como por la obtención de una proteína de similar tamaño por inmunoprecipitación. Estos resultados nos permite sugerir la posible homología estructural entre la subunidad α de *Homo sapiens* y la reportada en este trabajo para *T. evansi*. Adicionalmente, el anticuerpo fue capaz de reconocer una proteína presente en la membrana plasmática de parásito, la cual colocalización tanto con la tubulina, como con la dineína, proteínas estructurales del citoesqueleto (Fig. 66).

Todos estos resultados nos permite sugerir la posible existencia de un canal de Ca^{2+} en *T. evansi*, el cual podrá ser caracterizado mediante el uso de inhibidores específicos para los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} reportados. Futuros estudios podrán ayudar a discernir la presencia de uno o más tipos de canales de Ca^{2+} en estos parásitos.

La suma de los resultados obtenidos en nuestro trabajo sobre el estudio de las proteínas involucradas en la regulación de Ca^{2+} , nos permite sugerir el siguiente modelo de homeostasis de Ca^{2+} en *T. evansi*.

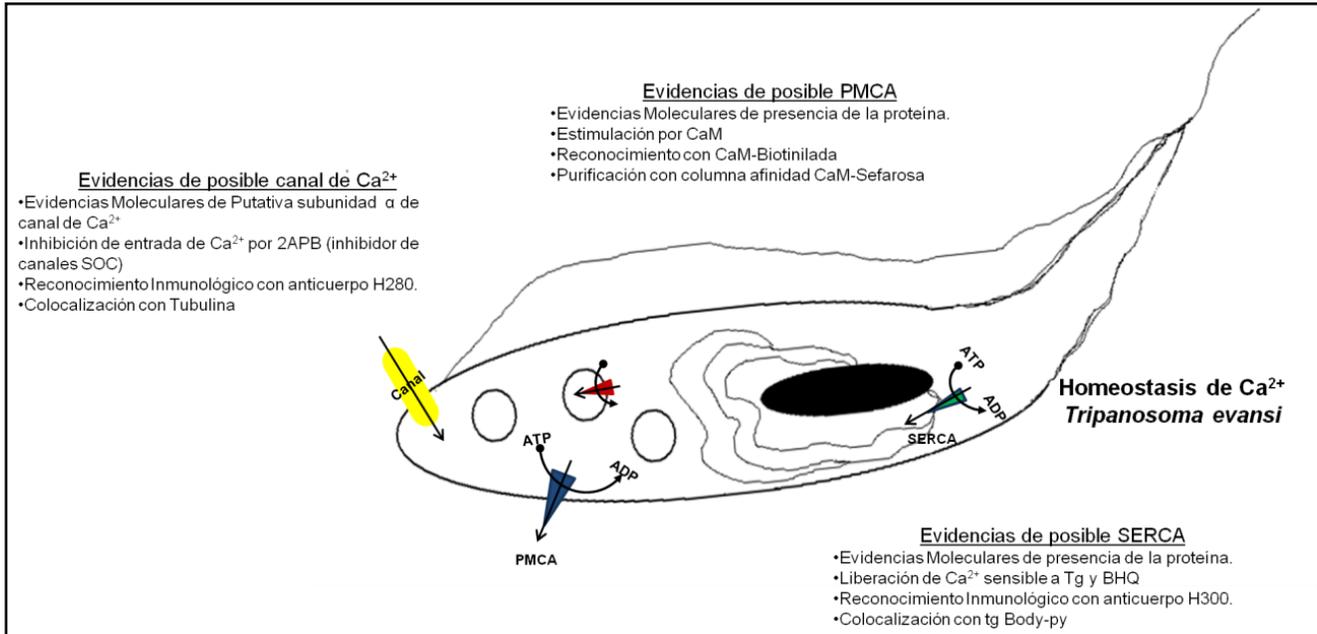


Figura 73. Modelo de Homeostasis e Ca^{2+} en *T. evansi*. Modelo que esquematiza los resultados obtenidos en la segunda parte de este trabajo. A nivel de membrana plasmática: la presencia de al menos dos familias de Canales de Ca^{2+} (tipo SOC y tipo voltaje dependiente), la presencia de una PMCA estimulada por CaM. A nivel de organelos: Una SERCA en retículo sensible a Tg y BHQ y una Ca^{2+} -ATPasa vacuolar a nivel de acidocalisoma.

6.- Conclusiones

Con respecto a la modulación de la Ca^{2+} ATPasa 4b de humanos por etanol y segundos mensajeros de origen lipídico, los resultados obtenidos en la primera parte de nuestro trabajo, nos permiten concluir:

1.

- Se logró estandarizar un sistema de expresión en células COS-7 de la PMCA nativa y formas truncadas $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$, el cual permitió estudiar funcionalmente la enzima y caracterizar los efectos del EtOH, DAG y la Ceramida sobre la misma.

2.

- Se observó un efecto estimulador del EtOH sobre la forma truncada $\Delta 44$ de la PMCA, perdiéndose su efecto en las formas truncadas $\Delta 139$ y $\Delta 118$. Sugiriéndose así una región de 46 aa en la región C-terminal de la enzima entre los aa 1115 y 1161 donde parece interactuar el alcohol.

3.

- Se observó un efecto aditivo del EtOH y la CaM sobre la forma nativa y forma truncada $\Delta 44$ de la PMCA sugiriéndose así un mecanismo de acción diferente del EtOH y la CaM sobre la enzima.

4.

- Los resultados obtenidos sobre el efecto del DAG y la Ceramida en las formas truncadas de la PMCA $\Delta 44$, $\Delta 118$ y $\Delta 139$ y la enzima silvestre purificada a partir de eritrocitos humanos, nos permiten sugerir que ambos moduladores lipídicos interactúan sobre la enzima en el dominio A_L encontrado en la región N-terminal, donde interactúa la PS, ya que no se observó efecto aditivo entre DAG-Ceramida, DAG-PS, Ceramida-PS ni DAG-Ceramida-PS.

5.

- De los resultados obtenidos podemos sugerir que el DAG y la Ceramida ejercen su efecto mediante un mecanismo de acción similar al de los fosfolípidos ácidos y diferente al de la CaM y el EtOH.

Con respecto a la caracterización fisiológica, molecular, inmunológica y bioquímica de proteínas involucradas en la homeostasis de Ca²⁺ en Trypanosoma evansi, los resultados en este trabajo nos permiten sugerir:

1.

- Se evidenció la presencia de una Ca²⁺-ATPasa tipo PMCA en *T. evansi* de PM aparente de 120 KDa, la cual presenta 10 dominios transmembrana y los dominios clásicos que caracterizan a las ATPasas tipo P.
- Se evidenció inmunológicamente el reconocimiento por parte del anticuerpo 5F10 de una banda de PM aparente de 120KDa.
- Se evidenció la presencia de un dominio no-clásico de unión a CaM, así como la interacción directa entre la enzima y CaM mediante: el reconocimiento de una banda de PM aparente de 120KDa por la CaM biotinilada, la purificación de una banda de PM similar mediante el uso de una columna CaM Sefarosa, así como el aumento de la actividad Ca²⁺-ATPasa basal en presencia de CaM en vesículas de membrana.

2.

- Se evidenció la presencia de una Ca²⁺-ATPasa tipo vacuolar, de PM aparente 119.5 kDa, la cual no presenta un dominio de interacción con la CaM en el extremo C-Terminal.

3.

- Se evidenció la presencia de una Ca²⁺-ATPasa tipo SERCA de PM aparente de 110 KDa, la cual no presenta un dominio de interacción con la CaM en el extremo C-Terminal y es sensible a la Tapsigargina y la Benzoquinona.

4.

- Se evidenció la presencia de canales de Ca²⁺, los cuales presentaron características similares a la familia de canales tipo SOC y voltaje dependiente según la aproximación utilizada.

7. Referencias Bibliográficas

1. Abernethy, D. y Soldatov, N. (2002) "Structure function diversity of human L-type Ca^{2+} channel: perspectives for new pharmacological targets". *J Pharmacol Exp Ther.* 300:724-28.
2. Adamo, H.; Caride, A. y Penniston, J. (1992a). "Use of expression mutants and monoclonal antibodies to map the erythrocyte Ca^{2+} pump". *J. Biol. Chem.* 267: 14244-49.
3. Adamo, H.; Verma, A.; Sanders, M.; Heim, R.; Salisbury, J.; Wieben, E. y Penniston, J. (1992b). "Overexpression of the erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} pump in COS-1 cells. *Biochem J.* 285 (Pt 3):791-7.
4. Alling, C., Gustavsson, L., Mansson, J., Benthin, G. and Anggard, E. (1984). "Phosphatidylethanol formation in rat organs after ethanol treatment". *Biochim. Biophys. Acta* 793:119-122.
5. Asaoka, Y., Kikkawa, U., Sekiguchi, K., Shearman, M.S., Kosaka, Y., Nakano, Y., Satoh, T. & Nishizuka, Y. (1988). "Activation of a brain-specific protein kinase C subspecies in the presence of phosphatidylethanol". *FEBS Lett* 231, 221-24.
6. Beaugé, L. y DiPolo, R. (2005). "SEA-0400, a potent inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, as a tool to study exchanger ionic and metabolic regulation". *Am J Physiol Cell Physiol.* 288(6):C1374-80.
7. Benaim, G. (1990). "Estudio sobre en mecanismo catalítico y la regulación de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática". Tesis Doctoral. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela.
8. Benaim, G. (1992). "La Calmodulina y la Regulación de la Ca^{2+} -ATPasa de la Membrana Plasmática de Eritrocitos Humanos". En mecanismos de transporte iónico en membranas biológicas. F. proverbio y G. Benaim (Eds.). Auspiciado por la Sociedad Venezolana de ciencias Fisiológicas y Centro de Estudios avanzados (CEA) del Instituto Venezolano de investigación Científica (IVIC). pp: 47-33
9. Benaim, G. (1993). "Homeostasis intracelular del calcio. La calmodulina y la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de Tripanosomatidios". *Acta Cient. Venez.* 44: 57-66.
10. Benaim, G. y Cervino, V. (2000). "Intracellular calcium homeostasis and signaling in Trypanosomatids". *Elect J. Pathol. Histol.* 6: 1- 11.

11. Benaim, G. y de Meis, L. (1989). "Activation of the purified erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by organic solvents". *FEBS Lett.* 244: 484-86.
12. Benaim, G., Cervino, V., Lopez-Estraño, C. y Weitzman, C. (1994). "Ethanol stimulate the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes". *Biochem. Biophys. Acta.* 1195: 141-48.
13. Benaim, G., Lopez-Estraño, C.; Docampo, R. y Moreno, S. (1993b). "A calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump in plasma-membrane vesicle from *Trypanosoma brucei*, selective inhibition by pentamidine". *Biochem J.* 296: 759-63.
14. Benaim, G., Moreno, S.N.J., Hutchinson, G., Cervino, V., Hermoso, T., Romero, P.J., Ruiz, F., de Souza, W. y Docampo, R. (1995). "Characterization of the plasma membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*". *Biochem. J.* 306: 299-303.
15. Benaim, G.; Bermudez, R. y Urbina, J. (1990). " Ca^{2+} transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes". *Mol Biochem Parasitol.* 39: 61-68.
16. Benaim, G.; Cervino, V., Hermoso, T., Felibert, P. y Laurentin, A. (1993a). "Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulina-dependent Ca^{2+} -ATPase ". *Biol. Res.* 26: 141-50.
17. Benaim, G.; Clark, A. y Carafoli, E. (1986). "ATPase activity and Ca^{2+} transport by reconstituted tryptic fragments of the Ca^{2+} pump of the erythrocyte plasma Membrane". *Cell Calcium.* 7(3):175-86.
18. Benaim, G.; Losada, S.; Gadelha, F. y Docampo, R. (1991). "A calmodulin-activated (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase is involved in Ca^{2+} transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*". *Biochem. J.* 280: 715-20.
19. Benaim, G.; Zurini, M. y Carafoli, E. (1984). "Different conformational states of the purified Ca^{2+} -ATPase of the erythrocyte plasma membrane revealed by controlled trypsin proteolysis". *J Biol Chem.* 259(13):8471-7.
20. Benaim, G. y Romero, P. (1990). "A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*". *Biochim Biophys Acta.* 1027(1):79-84.
21. Benoff, S.; Chu, C.; Marmar, J.; Sokol, R.; Goodwin, L. y Hurley, I. (2007). "Voltage-dependent calcium channels in mammalian spermatozoa revisited". *Frontiers in Bioscience.* 12: 1420-1449.

22. Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976). "Assay of proteins in the presence of interfering materials". *Anal Biochem.* 70(1):241-50.
23. Berriman, M.; Ghedin, E.; Hertz-Fowler, C.; Blandin, G.; Renaud, H.; Bartholomeu, D.; Lennard, N.; Caler, E.; Hamlin, N.; Haas, B.; Böhme, U.; Hannick, L.; Aslett, M.; Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B.; Alsmark, U., Arrowsmith, C., Atkin, R., Barron, A.; Bringaud, F., Brooks, K.; Carrington, M.; Cherevach, I.; Chillingworth, T., Churcher, C.; Clark, L.; Corton, C.; Cronin, A.; Davies, R.; Doggett, J.; Djikeng, A.; Feldblyum, T.; Field, M., Fraser, A.; Goodhead, I., Hance, Z.; Harper, D.; Harris, B.; Hauser, H.; Hostetler, J.; Ivens, A.; Jagels, K.; Johnson, D.; Johnson, J.; Jones, K.; Kerhornou, A.; Koo, H.; Larke, N., Landfear, S.; Larkin, C.; Leech, V.; Line, A.; Lord, A., Macleod, A.; Mooney, P., Moule, S.; Martin, D., Morgan, G., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D.; Pai, G.; Peacock, C.; Peterson, J.; Quail, M.; Rabbinowitsch, E.; Rajandream, M., Reitter, C., Salzberg, S.; Sanders, M.; Schobel, S.; Sharp, S.; Simmonds, M.; Simpson, A.; Tallon, L.; Turner, C.; Tait, A.; Tivey, A.; Van, Aken, S.; Walker, D.; Wanless, D., Wang, S.; White, B., White, O., Whitehead, S.; Woodward, J.; Wortman, J.; Adams, M.; Embley, T.; Gull, K.; Ullu, E.; Barry, J.; Fairlamb, A.; Opperdoes, F.; Barrell, B.; Donelson, J.; Hall, N.; Fraser, C.; Melville, S. y El-Sayed, N. (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." *Science.* 309(5733):416-22.
24. Bezanilla, F.(2005). Voltage-gated ion channels. *IEEE Trans Nanobioscience.* 4(1):34-48
25. Blaustein, M. y Lederer, W. (1999). "Sodium/calcium exchange: its physiological implications". *Physiol Rev.* 79(3):763-54
26. Bootman, M.; Collins, T., Mackenzie, L., Roderick, H.L.; Berridge, M. y Peppiatt, C. (2002). "2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of $InsP_3$ -induced Ca^{2+} release". *FASEB J.* 16(10):1145-50.
27. Brandenburger, T.; Strehler, E.; Filoteo, A.; Caride, A.; Aumüller, G.; Post, H.; Schwarz, A. y Wilhelm, B. (2011). "Switch of PMCA4 splice variants in bovine epididymis results in altered isoform expression during functional sperm maturation". *J Biol Chem.* 286(10):7938-46.
28. Brandl, C.; green, N.; Korczak, B. y MacLennan, D. (1986). "Two Ca^{2+} -ATPase genes: Homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences". *Cell.* 44: 597-607.

29. Bridges, D.; Pitt, A.; Hanrahan, O., Brennan, K.; Voorheis, H.; Herzyk, P.; de Koning, H. y Burchmore, R. (2008). "Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*". *Proteomics*. 8(1):83-99
30. Brini M. y Carafoli, E. (2000). "Calcium signalling: a historical account recent developments and future perspectives". *Cell. Mol. Life Sci*. 57: 354- 70.
31. Brini, M. y Carafoli, E. (2009). "Calcium pumps in health and disease". *Physiol Rev*. 89:1341-1378.
32. Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T. & Carafoli, E. (1992). "Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca^{2+} pump". *Eur.J. Biochem*. 204, 939-46.
33. Brose, N.; Betz, A.; y Wegmeyer, H. (2004). "Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals". *Curr Opin Neurobiol*. 14(3):328-40.
34. Carafoli, E. (1991). "Calcium pump of the Plasma membrane". *Physiol. Rev*. 71: 129- 53.
35. Carafoli, E. (1987). "Intracellular calcium homeostasis". *Ann. Rev. Biochem*. 56:395-433.
36. Carafoli, E. (1992). "The Ca^{2+} pump of the plasma membrane." *J. Biol. Chem*. 267: 2115- 18.
37. Carafoli, E. (2002). "Calcium signaling: a tale for all seasons". *Proc Natl Acad Sci U.S A*. 5;99(3):1115-22.
38. Carafoli, E. y Stauffer, T. (1994). "The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression". *J. Neurobiol*. 25: 312- 24.
39. Carafoli, E., García-Martin, E. y Guerini, D. (1996). "The plasma membrane calcium pump: Recent developments and future perspectives". *Experientia*. 52: 1091-1100.
40. Carafoli, E.; Zurini, M. y Benaim, G. (1985). "The purified calcium ATPase of plasma membrane. Structure-Function Relationships". En *Calcium in Biological Systems*. R.P. Rubin, G.B. Weiss y J. W Putney Jr. (Eds.). Plenum press, New York. pp: 265-73.
41. Carafoli, E.; Santaella, L.; Brance, D. y Brisi, M. (2001). "Generation, control, and processing of cellular calcium signals". *Crit. Rev. biochem. Mol. Biol*. 36: 107-60.

42. Catisti, R.; Uyemura, S.; Docampo, R. y Vercesi, A. (2000). "Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids". *Mol Biochem Parasitol.* 105:261-71.
43. Catterall, W. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels". *Annu. Rev. cell Dev. Biol* 16: 521-55.
44. Cervino, V.; Benaim, G.; Carafoli, E. y Guerini, D. (1998). "The effect of ethanol on the plasma membrane calcium pump is isoform specific". *J. Biol. Chem.* 273: 29811-15.
45. Chagot, B.; Potet, F.; Balsler, J. y Chazin, W. (2009). "Solution NMR structure of the C-terminal EF-hand domain of human cardiac sodium channel NaV1.5". *J Biol Chem.* 284(10):6436-45.
46. Chang, W. (2006). "Store-operated calcium channels and pro-inflammatory signals". *Acta Pharmacologica Sinica* . 27 (7): 813–20.
47. Chen, C. y Okayama, H. (1987). "High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA". *Mol Cell Biol.* 7(8):2745-52
48. Choquette, D., Hakim, G., Filoteo, A.G., Plishker, G.A., Bostwick, J.R. & Penniston, J. T. (1984). "Regulation of plasma membrane Ca²⁺ ATPases by lipids of the phosphatidylinositol cycle". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 908-915.
49. Claros, M.G. y von Heijne, G. (1994) TopPred II: An Improved Software For Membrane Protein Structure Predictions. *CABIOS* 10: 685-686.
50. Colina, C., Cervino, V. y Benaim, G. (2002). "Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma-membrane Ca²⁺-ATPase from human erythrocytes". *Biochem. J.* 362: 247- 51.
51. Coronado, A.; Paez, V.; Delgado, A. y Castillo, A. (1996). "Clinical finding in *Trypanosoma evansi* infected guinea pigs. Proceedings of first symposium on new world Trypanosomes". *Guyana*. Pp 72-4.
52. Docampo, R. (1993). "Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*." *Biol Res.* 26:189-96.
53. Docampo, R. y Moreno, S. (1996). "The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites". *Parasitol Today.* 12: 615-19.
54. Docampo, R. y Moreno, S. (1999). "Acidocalcisome: a novel Ca²⁺ storage compartment in Trypanosomatids and Apicomplexan parasites". *Parasitol Today.* 15:443-448.
55. Docampo, R. y Pignataro, O. (1991). "The inositol phosphate/diacylglycerol signaling pathway in *Trypanosoma cruzi*" *Biochem J.* 275:407-11.

56. Docampo, R. y Vercesi A. (1989) "Ca²⁺ transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria in situ". *J Biol Chem* .264:108-11.
57. Docampo, R.; Moreno, S. y Vercesi, A. (1993). "Effect of thapsigargin on calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes". *Mol Biochem Parasitol*. 59:305-14.
58. Docampo, R.; Scott, D.; Vercesi ,A. y Moreno, S.(1995). "Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi* ". *Biochem J* .310:1005-12.
59. Docampo, R. y Moreno, S. (2001). "Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites". *Curr Drug Targets Infect Disord*. 1(1):51-61.
60. Dolan, M. T.; Reid, C. G. y Voorheis, P. (1986). "Calcium ions initiate the selective depolymerization of the pellicular microtubules in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*". *J. Cell Sci*. 80: 123-40.
61. Dunham, E.T y Glynn, I.M. (1961). "Adenosine-Triphosphatase Activity and the Active Movememts of Álcali Metal Ions". *J. Physiol. Lond*. 156: 274- 93.
62. Dupont, Y. y Pougeois, R. (1983). "Evaluation pf H₂O activity in the free or phosphorylated catalytic sites of Ca²⁺-ATpase". *FEBES Lett*. 156:93-98.
63. Eintracht, J.; Maathai, R.; Mellors, A. y Ruben, L. (1998). "Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A₂ and arachidonic acid". *Biochem J*. 336 (Pt 3):659-66.
64. Enyedi, A., Flura, M.; Sarkadi, B., Gardos, G. & Carafoli, E. (1987). "The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently". *J. Biol. Chem*. 262: 6425-30.
65. Enyedi, A.; Sarkadi, B.; Szasz, I.; Bot, B. y Gardos, G. (1980). " Molecular properties of the red cell calcium pump. Effects of calmodilin, proteolytic digeston and drugs on the calcium-induced membrane phosphorylation by ATP in inside – out rel cell membrane vesicles". *Cell Calcium*. 1:299-310.
66. Enyedi, A.; Verma, A.; Filoteo, A. y Penniston, J. (1996). "Protein kinase C activates the plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain." *J Biol Chem*. 271(50):32461-7.
67. Enyedi, A.; Verman, A., Filoteo, A. y Penniston, J. (1993). " A highly active 120-KDa truncated mutant of the plasma membrane Ca²⁺ pump". *J. Biol. Chem*. 268: 10621-26

68. Fabiato, A. y Fabiato, F. (1979). "Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells." *J Physiol (Paris)*. 75(5):463-505.
69. Fallon, J.; Baker, M.; Xiong, L.; Loy, R.; Yang, G.; Dirksen, R.; Hamilto, S. y Quioco, F. (2009). "Crystal structure of dimeric cardiac L-type calcium channel regulatory domains bridged by Ca^{2+} calmodulins". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(13):5135-40.
70. Filoteo, A.G., Enyedi, A. & Penniston, J.T. (1992). "The lipid-binding peptide from the plasma membrane Ca^{2+} pump binds calmodulin, and the Primary calmodulin-binding domain interacts with lipid". *J. Biol. Chem.* 267, 11800-05.
71. Findeisen, F. y Minor, D. (2010). "Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (CaV) function and modulation". *Channels*. 4(6):459-74.
72. Fiske, C.H. y Subbarow, Y. (1925). "The colorimetric determination of phosphorus". *J. Biol. Chem.* 259: 15172 - 77.
73. Falcheto, R.; Vorherr, T. y Carafoli, E. (1992). "The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of enzyme". *Prot Sci*. 1: 1613-21.
74. Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J. y Carafoli, E. (1991). "The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulina-binding domain". *J. Biol. Chem.* 266: 2930-36.
75. Foder, B. y Scharff, O. (1981). "Decrease of apparent calmodulin affinity of erythrocyte ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase at low Ca^{2+} concentrations". *Biochim. Biophys. Acta*. 649: 367- 76.
76. Franzini-Armstrong, C. y Protasi, F. (1997). "Ryanodine receptors of striated muscle: a complex channel capable of multiple interactions". *Physiol Rev*. 77: 699-729.
77. Furuya, T., Okura, M., Ruiz, F. A., Scott, D. A., y Docampo, R. (2001). "TcSCA Complements Yeast mutants defective in Ca^{2+} pumps and encodes a Ca^{2+} -ATPase that localizes to the endoplasmic reticulum of *Trypanosoma cruzi*." *J. Biol. Chem.* 276: 32437-45.

78. Gandhi, C. y Ross, D. (1989). "Influence of ethanolon calcium, inositol phospholipids and intracellular signaling mechanisms". *Experiential*. 45:407-13.
79. Ganong, B.; Loomis, C.; Hannun, Y. y Bell, R. (1986). "Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(5):1184-8.
80. Garrahan, P.J. y Rega, A.F. (1990). "Plasma membrane calcium pump. An intracellular calcium regulation". Alan R. Liss, Inc. pp: 271 – 303.
81. Gasteiger, E., Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.; Appel, R. y Bairoch, A. (2005). "*Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*;"
(In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press" .
Full text - Copyright Humana Press.
82. Gopinath, R.M. y Vincenzi, F.F. (1977). "Phosphodiesterase protein activator mimics the red blood cell cytoplasmic activator of the (Ca²⁺ + Mg²⁺) ATPase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 1203- 09.
83. Gornall, A.; Bardawill, C. y David, M. (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction". *J Biol Chem.* 177(2):751-66.
84. Grynkiewicz, G.; Poenie, M. y Tsien, R. (1985). "A new gwneration of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties". *J Biol Chem.* 260:3440-3450.
85. Guerini, D. (1998). "The significance of the isoforms of the plasma membrane calcium ATPase". *Cell tissue Res.* 292: 191-97.
86. Guerini, D.; Guidi, F. y Carafoli, E. (2002). "Differential membrane targeting of the SERCA and PMCA calcium pumps: experiments with recombinant chimeras". *FASEB J.* 16(6):519-28.
87. Gustavsson, L. & Alling, C. (1987). "Formation of phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 958-963.
88. Harris, R. y Allan ,A. (1985). "Functional coupling of gamma-aminobutyric acid receptors to chloride channels in brain membranes". *Science.* 228(4703):1108-10.
89. Heim, R.; Iwata, T.; Zvaritch, E.; Adamo, H., Rutishauser, B.; Strehler, E.; Guerini, D. y Carafoli, E. (1992). "Expression, purification, and properties of the plasma membrane Ca²⁺ pump and of its N-terminally truncated 105-kDa fragment". *J Biol Chem.* 267(34):24476-84.

90. Hilfiker, H., Guerini, D. y Carafoli, E. (1994). "Cloning and expression of isoform 2 of the human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase". *J. Biol. Chem.* 269: 26178- 83.
91. Hinds, T.R.; Raess, B.U. & Vincenzi, F.F. (1981). "Plasma membrane Ca^{2+} - transport: Antagonism by several potential inhibitors". *J. Memb. Biol.* 58: 57-65.
92. Hoek, J.B.; Thomas, A.P.; Rubin, R. & Rubin, E. (1987). "Ethanol - induced mobilization of calcium by activation of phosphoinositide - specific phospholipase C in intact hepatocytes". *J. Biol. Chem.* 262: 682-691.
93. Hofmann, F., Anagli, J.; Carafoli, E. y Vorherr, T. (1994). "Phosphorylation of the calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump by protein kinase C reduces its interaction with calmodulin and with its pump receptor site. *J Biol Chem.* 269(39):24298-303.
94. Holwill, M.E.J y McGregor, J.L. (1976). "Effects of calcium on flagellar movement in the Trypanosome *Crithidia oncopelti*". *J. Exp. Biol.* 65: 229-42.
95. Inesi, G.; Hua, S., Xu, C.; Ma, H.; Seth, M.; Prasad, A. y Sumbilla, C. (2005). "Studies of Ca^{2+} ATPase (SERCA) inhibition". *J Bioenerg Biomembr.* 37(6):365-8.
96. James, P., Maeda, M., Fischer, R., Verma, A.K., Krebs, J., Penniston, J.T. y Carafoli, E. (1988). "Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca^{2+} -pump of human erythrocytes". *J. Biol. Chem.* 263: 2905- 10.
97. James, P., Vorherr T., Krebs, J., Morelli, A., Castello, G., McCormick, D. J., Penniston J. T., De Flora A. y Carafoli, E. (1989). "Modulation of the erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin binding domain". *J. Biol. Chem.* 264: 8289- 96.
98. Jarret, H. W. y Penniston, J.T. (1977). "Partial purification of the (Ca^{2+} + Mg^{2+}) - ATPase activator from human erythrocytes: Its similarity to the activator 3'-5' cyclic nucleotide phosphodiesterase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 1210-16.
99. Kelley, L. y Sternberg, M. (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." *Nat Protoc.* 4(3):363-71.
100. Kessler, F., Bernardini, F., Bachs, O., Serratosa, P., James, P., Caride, A.J., Gazzotti, P., Penniston, J.T. y Carafoli, E: (1990). "Partial purification and characterization of the pumping ATPase of the liver plasma membrane". *J. Biol. Chem.* 265: 16012- 19.

101. Kim, E., Rumpf, C.; Fujiwara, Y.; Cooley, E., Van-Petegem, F. y Minor, D. (2008). "Structures of CaV2 Ca²⁺/CaM-IQ domain complexes reveal binding modes that underlie calcium-dependent inactivation and facilitation". *Structure*. 16(10):1455-67.
102. Klee, C. y Vanaman, T. (1982). "Calmodulin". *Adv. Protein. Chem.* 34: 213-21.
103. Kobayashi, M. & Kanfer, J.N. (1987). "Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase D". *J. Neurochem.* 48: 1597-1603.
- 104.** Kobrinsky E.; Tiwari, V; Maltsev, J.; Harry, J.; Lakatta, E.; Abernethy, D. y Soldatov, N. (2005). "Differential role of the alpha 1C subunit tails in regulation of the Cav1.2 channel by membrane potential, beta subunits, and Ca²⁺ ions". *J Biol. Chem.* 280: 12474-85
105. Laemmli, U. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T42". *Nature* 227:680-685.
106. Lanham, S. y Godfrey, D. (1970). "Isolation of salivarian Trypanosomes from Man and other mammals using DEAE-Cellulose". *Exp Parasitol.* 28:521-534.
107. Larocca, J., Rega, A.F. y Garrahan, P. (1981). "Phosphorylation and dephosphorylation of the Ca²⁺ pump of human red cells in the presence of monovalent cations". *Biochim. Biophys. Acta.* 645: 10-16.
108. Laursen, M.; Bublitz, M.; Moncoq, K.; Olesen, C.; Møller, J.; Young, H.; Nissen, P. y Morth, J. (2009). "Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase". *J Biol Chem.* 284(20):13513-8.
109. Lee, M. y Severson, D. (1994). "Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action". *Am J Physiol.* 267(3 Pt 1):C659-78.
110. Lehotsky, J., Raeymaekers, L., Missiaen, L., Wuytack, F., De Smedt, H. & Casteels, R. (1992). "Stimulation of the catalytic cycle of the Ca²⁺ pump of porcine plasma-membranes by negatively charged phospholipids". *Biochim. Biophys. Acta* 1105, 118-124.
111. Lievreumont, J.; Bird, G. y Putney, J. (2005). "Mechanism of inhibition of TRPC cation channels by 2-aminoethoxydiphenylborate". *Mol Pharmacol.* 68(3):758-62.

112. Lipkind, G. y Fozzard, H. (2001). "Modeling of the outer vestibule and selectivity filter of the L-type Ca^{2+} channel". *Biochemistry*. 40(23):6786-94.
113. Llopis, J.; Chow, S.; Kass, G.; Gahm, A. y Orrenius, S. (1991). "Comparison between the effects of the microsomal Ca^{2+} -translocase inhibitors thapsigargin and 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone on cellular calcium fluxes". *Biochem J*. 277 (Pt 2):553-6.
114. Long, S.; Tao, X.; Campbell, E. y MacKinnon, R. (2007). "Atomic structure of a voltage-dependent K^+ channel in a lipid membrane-like environment". *Nature*. 450(7168):376-82.
115. Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. y Randall, R. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J Biol Chem*. 193(1):265-75.
116. Lu, H. G., 1 Zhong, L. De Souza, W.; Benchimol M., Moreno, S. y Docampo, R. (1998). " Ca^{2+} Content and Expression of an Acidocalcisomal Calcium Pump Are Elevated in Intracellular Forms of *Trypanosoma cruzi*". *Molecular and Cellular Biology*. 18: 2309-23.
117. Lu, H., Zhong, L.; Chang, K. y Docampo, R. (1997). Intracellular Ca^{2+} pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J Biol Chem*. 4:9464-9473.
118. Luo, S.; Rohloff, P.; Cox, J.; Uyemura, S.A. y Docampo, R. (2004). "*Trypanosoma brucei* plasma membrane type Ca^{2+} -ATPase 1 (TbPMC1) and 2 (TbPMC2) genes encode functional Ca^{2+} -ATPase localized to acidocalcisome and plasma membrane and essential for Ca^{2+} homeostasis growth". *J. Biol. Chem*. 279: 14427 - 39.
119. Mel'gunov, V.; Dzhindal, S. y Belikova, M. (1987). "Dual effect of ethanol and other aliphatic alcohols on the effectiveness of the Ca-pump and Ca-ATPase activity of the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscles". *Biokhimiia*. 52(10):1688-95.
- 120.** Mendoza M, Uzcanga GL, Pacheco R, Rojas H, Carrasquel LM, García-Marchan Y, Serrano-Martín X, Benaím G, Bubis J, Mijares A. (2008). Anti-VSG antibodies induce an increase in *Trypanosoma evansi* intracellular Ca^{2+} concentration. *Parasitology*. 135(11):1303-15
121. Mendoza, M., Mijares, A., Rojas, H. Colina., Cervino, V, DiPolo R., y Benaim. G. (2004). "Evaluation of the presence of a thapsigargin-sensitive calcium store in trypanosomatids using *Trypanosoma evansi* as a model". *J. Parasitol*. 5:1181-3.

122. Mendoza, M.; Mijares, A.; Rojas, H.; Ramos, M. y DiPolo, R. (2001). "Trypanosoma evansi: a convenient model for studying intracellular Ca(2+) homeostasis using fluorometric ratio imaging from single parasites. *Exp Parasitol.* 99(4):213-9.
123. Mendoza, M.; Mijares, A.; Rojas, H.; Rodríguez, J.; Urbina, J. y DiPolo, R. (2002). "Physiological and morphological evidences for the presence acidocalcisomes in *Trypanosoma evansi*: single cell fluorescence and 31P NMR studies". *Mol Biochem Parasitol.* 125(1-2):23-33.
124. Missiaen, L., Raeymaekers, L., Droogmans, G., Wuytack, F., & Casteels, R. (1989b). "Role of arginine residues in the stimulation of the smooth-muscle plasma-membrane Ca²⁺ pump by negatively charged phospholipids". *Biochem. J.* 264, 609-612.
125. Moncoq, K.; Trieber, C. y Young, H. (2007). "The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump". *J Biol Chem.* 282(13):9748-57.
126. Montigny, C.; Picard, M.; Lenoir, G.; Gauron, C.; Toyoshima, C. y Champeil, P. (2007). "Inhibitors bound to Ca(2+)-free sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase lock its transmembrane region but not necessarily its cytosolic region, revealing the flexibility of the loops connecting transmembrane and cytosolic domains". *Biochemistry.* 46(51):15162-74.
127. Moreno SNJ, Docampo R, Vercesi AE (1992b) "Calcium homeostasis in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*". *J Biol Chem.* 267:6020-26.
128. Moreno, S. y Doacampo, R. (2003). "Calcium regulation in protozoan parasite". *Current Opinión in Microbiol.* 6: 359 - 63
129. Moreno, S.; Vercesi, A.; Pignataro, O. y Docampo, R. (1992a). "Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes: presence of inositol phosphates and lack of an inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive calcium pool". *Mol Biochem Parasitol.* 52:251-61.
130. Moreno, S. y Docampo, R. (2009). "The role of acidocalcisomes in parasitic protists". *J Eukaryot Microbiol.* 56(3):208-13.
131. Morrow, C.D., Flory-Granger, B. y Krassner, S.M. (1981). "Effect of the ionophores A23187 and X-537A (Lasalocid) and of the divalent cations Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺ y Mn²⁺ on the transformation in *Leishmania donovani*". *Comp. Biochem. Physiol.* 69A: 65 -72.

132. Mueller, G., Fleming, M., Lemahien, M, Lybrand, G & Barry, K. (1988). "Synthesis of phosphatidylethanol a potential marker for adult males at risk for alcoholism". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9778-9782.
133. Neira, I.; Ferreira, A. y Yoshida, N. (2002). "Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells". *Int J Parasitol.* 32(4):405-14
134. Niggli, V.; Zurini, M. y Carafoli, E. (1987). "Purification, reconstitution, and molecular characterization of the Ca^{2+} pump of plasma membranes". *Methods Enzymol.* 139:791-808.
135. Niggli, V., Adunyah, E.S. y Carafoli, E. (1981). "Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase". *J. Biol. Chem.* 256: 8588 - 92.
136. Niggli, V.; Penniston, J. y Carafoli, E. (1979). "Purification of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column". *J. Biol. Chem.* 254: 9955-58.
137. Nishizuka, Y. (1995). "Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses". *FASEB J.* 9(7):484-96.
138. Nolan, D.P.; Revelard, P. y Pays, E. (1994). "Overexpression and characterization of a gene for a Ca^{2+} -ATPase of the endoplasmic reticulum in *Trypanosoma brucei*". *J. Biol. Chem.* 269: 26045 - 51.
139. Nørregaard, A., Vilsen, B. y Andersen, J. (1994). "Transmembrane segment M3 is essential to thapsigargin sensitivity of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase". *J Biol Chem.* 269(43):26598-601.
140. Obara, K.; Miyashita, N.; Xu, C.; Toyoshima, I.; Sugita, Y.; Inesi, G. y Toyoshima, C. (2005). "Structural role of countertransport revealed in Ca^{2+} pump crystal structure in the absence of Ca^{2+} ". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(41):14489-96.
141. Ohanian, J.; Liu, G.; Ohanian, V. y Heagerty, A. (1998). "Lipid second messengers derived from glycerolipids and sphingolipids, and their role in smooth muscle function". *Acta Physiol Scand.* 164(4):533-48.
142. Oldershaw, K. y Taylor, C. (1990). "2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone mobilizes inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive Ca^{2+} stores". *FEBS Lett.* 274: 214-216.

143. Olesen, C.; Picard, M.; Winther, A.; Gyruup, C.; Morth, J.; Oxvig, C.; Møller, J. y Nissen, P. (2007). "The structural basis of calcium transport by the calcium pump". *Nature*. 450(7172):1036-42.
144. Oz, H., Wittner, M.; Tanowitz, H.; Bilezikian, J.; Saxon, M. y Morris, S. (1992). "Trypanosoma cruzi: mechanisms of intracellular calcium homeostasis." *Exp Parasitol*. 74:390-99.
145. Papp, B.; Sarkadi, B.; Enyedi, A.; Caride, A.; Penniston, J. y Gardos, G. (1989). "Functional domains of the in situ red cell membrane calcium pump revealed by proteolysis and monoclonal antibodies. Possible sites for regulation by calpain and acidic lipids". *J Biol Chem*. 264(8):4577-82.
146. Parekh, A. y Putney, J. (2005). "Store-operated calcium channels". *Physiol Rev*. 85:757-810.
147. Paveto, C.; Pereira, C.; Espinosa, J.; Montagna, A.; Farber, M.; Esteva, M.; Flawiá, M. y Torres, H. (1995). "The nitric oxide transduction pathway in Trypanosoma cruzi." *J Biol Chem*. 270(28):16576-9.
148. Pérez-Gordones, M.; Lugo, M.; Winkle, M.; Cervino, V. y Benaim, G. (2009). "Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes by direct interaction". *Arch Biochem Biophys*. 489(1-2):55-61.
149. Philosoph, H, Zilberstein D (1989) Regulation of intracellular calcium in promastigotes of the human protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 264:10420-24.
150. Portillo, R.; Bruges, G.; Delgado, D., Betancourt, M. y Mijares, A. (2010). "Trypanosoma evansi: pharmacological evidence of a nicotinic acetylcholine receptor". *Exp Parasitol*. 125(2):100-5.
151. Potier, M. y Trebak, M. (2008). "New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway". *Pflugers Arch*. 457(2):405-15.
152. Putney, J. (2007). "New molecular players in capacitative Ca^{2+} entry". *J. Cell Science*. 120:1959-65.
153. Raess, B.U., Record, D.M. & Tunnicleff, G. (1985). "Interaction of phenylglyoxal with the human erythrocyte (Ca^{2+} + Mg^{2+})-ATPase. Evidence for the presence of an essential arginyl residue. *Mol. Pharmacol*. 27: 444-450.
154. Rega, A. y Garrahan, P. (1975). "Calcium Ion dependent phosphorylation of human erythrocyte membranes". *J. Membrane Biol*. 22: 313-27.

155. Rodriguez, N.; Docampo, R.; Hong-gang, L. y Scott, D. (2002). "Overexpression of the *Leishmania amazonensis* Ca²⁺-ATPase gene *Imaa1* enhances virulence." *Cellular Microbiology*. 4: 117-26.
156. Ronner, P., Gazzotti, P. y Carafoli, E. (1977). "A lipid requirement for the (Ca²⁺ + Mg²⁺) -activated ATPase of erythrocyte membranes". *Arch. Biochem. Biophys.* 179: 578 - 83.
157. Røttingen, J. y Iversen, J. (2000). "Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signalling". *Acta Physiol Scand.* 169(3):203-19
158. Roy, N.; Nageshan, R.; Pallavi, R.; Chakravarthy, H.; Chandran, S.; Kumar, R., Gupta, A., Singh, R.; Yadav, S. y Tatu, U. (2010). "Proteomics of *Trypanosoma evansi* infection in rodents". *PLoS One*. ;5 (3):e9796.
159. Ruben, L. y Akains. (1992). "Trypanosoma brucei: the tumor promoter thapsigargin stimulates calcium release from an intracellular compartment in slender bloodstream forms". *Exp. Parasitol.* 74: 332 - 39.
160. Ruben, L.; Carl, D.; Nasser, A.; Haghighat, G. y Xue, L. (1996). "Calcium influx in *Trypanosoma brucei* can be induced by amphiphilic peptides and amines". *Mol Biochem Parasitol.* 81:191-200.
161. Rutter, G. y Rizzuto, R. (2000). "Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate connection". *Trends Biochem Sci.* 25(5):215-21
- 162.** Salido, G.; Sage, S. Y Rosado, J. (2009). "Biochemical and functional properties of store-operated Ca²⁺ channels." *Cellular signaling.* 21: 457-61
- 163.** Saris, N. y Carafoli, E. (2005). "A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria". *Biochemistry (Mosc).* 70(2):187-94.
- 164.** Sarkadi, B.; Enyedi, A.; Földes-Papp, Z. y Gárdos, G. (1986). "Molecular characterization of the in situ red cell membrane calcium pump by limited proteolysis". *J Biol Chem.* 261(20):9552-7.
165. Schatzmann, H. J. (1982). "The calcium pump of erythrocytes y others animal cells. En Membrana transport of calcium". E. Carafoli (Ed). Academic Press London. Pp:41- 108.
166. Schatzmann, H.J. (1966). "ATP - dependent Ca²⁺ extrusion from human red cells". *Experientia.* 22: 364-5

- 167.Scott, D.; Moreno, S. y Docampo, R. (1995). "Ca²⁺ storage in *Trypanosoma brucei*: the influence of cytoplasmic pH and importance of vacuolar acidity". *Biochem J.* 310:789-794.
- 168.Seidler, N.; Jona, I.; Vegh,M. y Martonosi, A. (1989)." Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem.* 264(30):17816-23.
- 169.Shayman, J. (2000). "Sphingolipids". *Kidney Int.* 58(1):11-26
- 170.Shull, G.E. y Greeb, J. (1988). "Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺ transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na⁺, K⁺ and other cation transport ATPases". *J. Biol. Chem.* 263: 8646 - 57.
- 171.Smallwood, J. I., Gugi, B. y Rasmussen, H. (1988). "Regulation of erythrocyte Ca²⁺
- 172.Søhoel, H., Jensen, A.; Møller, J.; Nissen, P.; Denmeade, S.; Isaacs, J.; Olsen. C. y Christensen, S. (2006)." Natural products as starting materials for development of second-generation SERCA inhibitors targeted towards prostate cancer cells". *Bioorg Med Chem.* 14(8):2810-5.
- 173.Soulsby, E. (1987). The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. *Immunol Lett.* 16(3-4):315-20.
- 174.Stojdl, D. y Clarke, M.(1996). "Trypanosoma brucei: analysis of cytoplasmic Ca²⁺ during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Exp Parasitol.* 83(1):134-46.
- 175.Streheler, E.; Filoteo, A.; Penniston, J y Caride, A. (2007). "Plasma-membrane Ca²⁺ pumps: structural diversity as the basis for functional versatility". *Biochem Soc. Trans.* 35 (Pt5):919-22.
- 176.Strehler, E. y Zacharias, D. (2001)." Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps". *Physiol Rev.* 81(1):21-50.
- 177.Strehler, E.; Strehler-Page M.; Vogel, G. y Carafoli ,E. (1989). "mRNAs for plasma membrane calcium pump isoforms differing in their regulatory domain are generated by alternative splicing that involves two internal donor sites in a single exon". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(18):6908-12.
- 178.Strehler, E. y Treiman, M. (2004). "Calcium pumps of plasma membrane and cell interior". *Curr Mol Med.* 4(3):323-35.

179. Striessnig, J., Murphy, B. y Catterall, W. (1991). Dihydropyridine receptor of L-type Ca^{2+} channels: identification of binding domains for $[3\text{H}](+)\text{-PN200-110}$ and $[3\text{H}]\text{azidopine}$ within the alpha 1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1; 88:10769-73
180. Sujú, M.; Davila, M., Poleo, G., Docampo, R. y Benaim, G. (1996). "Phosphatidylethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes". *Biochem. J.* 317: 933 - 38.
181. Taylor, C. y Laude, A. (2002). "IP3 receptors and their regulation by calmodulina and cytosolic Ca^{2+} ". *Cell Calcium.* 32: 321-34.
- 182.** Tezanos-Pinto, F. y Adamo, H. (2002). "Deletions in the acidic lipid-binding region of the plasma membrane Ca^{2+} pump. A mutant with high affinity for Ca^{2+} resembling the acidic lipid-activated enzyme". *J Biol Chem.* 277(15):12784-9.
183. Thastrup, O.; Cullen, P.; Drobak, B.; Hanley, M. y Dawson, A. (1990). "Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ ". *Proc Natl acad sci USA* 87:2466-2470.
184. Towbin, H.; Staehelin, T. y Bordon. J (1979). "Electrophoresis transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc Natl Acad Sci.* 76:4350-4354.
185. Toyoshima, C. y Nomura, H. (2002). "Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium". *Nature* 418: 605-611.
186. Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H. y Ogawa, H. (2000). "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution". *Nature* 405: 647-655.
187. Tusnády y Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server" *Bioinformatics* 17: 849-850
188. Tusnády, y Simon, I. (1998) Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Applications to Topology Prediction." *J. Mol. Biol.* 283: 489-506
189. Van- Petegem, F.; Chatelain, F. y Minor, D. (2005). "Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain- Ca^{2+} /calmodulin complex". *Nat Struct Mol Biol.* 12(12):1108-15.
190. Verbist, J.; Gadella, T.W.J.; Raeymaekers, L.; Wuytack, F.; Wirtz, K.W.A. & Casteels, R. (1991). "Phosphoinositide protein interactions of the plasma

- membrane Ca^{2+} transport as revealed by fluorescence energy transfer". *Biochim. Biophys. Acta* 1063: 1-6.
191. Vercesi, A. E. y Docampo, R. (1992). " Ca^{2+} transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*". *Biochem J.* 284: 463- 67.
192. Vercesi, A. E.; Macedo, D. V.; Lima, S. A.; Gadelha, F. R. y Docampo, R. (1990). " Ca^{2+} transport in digitonin-permeabilized trypanosomatids". *Mol. Biochem. Parasitol.* 42: 19- 24.
193. Vercesi, A.; Grijalba, M. y Docampo, R. (1997). "Inhibition of Ca^{2+} release from *Trypanosoma brucei* acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene: role of the Na^+/H^+ exchanger". *Biochem J.* ;328 (Pt 2):479-82
194. Vercesi, A.E.; Hoffmann, M.E.; Bernardes, C.F. y Docampo, R. (1993). "ATP and Ca^{2+} homeostasis in *Trypanosome cruzi*". *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26: 355 - 63.
195. Vercesi, A.; Bernardes, C.; Hoffman, M.; Gadelha, F. y Docampo, R. (1991). "Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ". *J Biol Chem.* 266:14431-34.
196. Verma, A.; Enyedi, A.; Filoteo, A. y Penniston, J. (1994). "Regulatory region of plasma membrane Ca^{2+} pump. 28 residues suffice to bind calmodulin but more are needed for full auto-inhibition of the activity". *J Biol Chem.* 269(3):1687-91.
197. Von Heijne, G. (1992) Membrane Protein Structure Prediction: Hydrophobicity Analysis and the 'Positive Inside' Rule. *J.Mol.Biol.* 225: 487-494.
198. Voorheis HP, Bowles DJ, Smith GA. (1982). Characteristics of the release of surface coat protein from bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 257:2300-04.
199. Voorheis HP, Martin BP. (1981). Characteristics of the calcium mediated mechanism activating adenylate cyclase in *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 116:471-77.
200. Vorherr, T.; Kessler, T.; Hofmann, F. y Carafoli, E. (1991). "The calmodulin-binding domain mediates the self association of the plasma membrane Ca^{2+} pump". *J. Biol. Chem.* 266: 22 - 27.
201. Vrolix, M.L.; Raeymaekers, F.; Wuytack, F.; Hoffmann, F. & Casteels, R. (1988). "Cyclic GMP - dependent protein kinase stimulates the plasmalemmal Ca^{2+} pump

- of smooth muscle via phosphorylation of phosphatidylinositol". *Biochem J.* 255: 855-863.
202. Wang, K.; Wright, L.; Machan, C.; Allen, B.; Conigrave, A. y Roufogalis, B. (1991). "Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes". *J Biol Chem.* 266(14):9078-85.
203. Winkler, M. (1998). "El diacilglicerol como posible modulador fisiológico de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática". *Trabajo de tesis Doctoral.*
204. Worley, P.; Zeng, W.; Huang, G.; Yuan, J.; Kim, J.; Lee, M. y Muallem, S. (2007). "TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels". *Cell Calcium.* 42(2):205-11.
205. Wrzosek A, Famulski KS, Lehotsky J, Piłkuła S. (1989). "Conformational changes of (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase of erythrocyte plasma membrane caused by calmodulin and phosphatidylserine as revealed by circular dichroism and fluorescence studies". *Biochim Biophys Acta.* 986(2):263-70
206. Wuytack, F. y Raeymaekers, L. (1992). "The Ca^{2+} -transport ATPases from the plasma membrane". *J Bioenerg Biomembr.* 24(3):285-300.
207. Xu, Xianghua y Colecraft, H. (2009). "Engineering proteins for custom inhibition of CaV channels". *Physiology.* 24: 210-218.
208. Yang, C. y Kazanietz, M. (2003). "Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC". *Trends Pharmacol Sci.* 24(11):602-8.
209. Yoshida, N.; Favoreto, S.; Ferreira, A. y Manque, P. (2000). "Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells". *Braz J Med Biol Res.* 33(3):269-78.
210. Zarayskiy, V.; Monje, F.; Peter, K.; Csutora, P.; Khodorov, B. y Bolotina, V. (2007). "Store-operated Orai1 and IP3 receptor-operated TRPC1 channel". *Channels (Austin).* 1(4):246-52.
211. Zvaritch, E.; James, P.; Vorherr, T.; Falchetto, R.; Modyanov, N. y Carafoli, E. (1990). "Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca^{2+} pump using trypsin proteolysis". *Biochemistry.* 4; 29(35):8070-6.