



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Caracterización de Tc53 y Tc80 de *Trypanosoma cruzi*.”

T E S I S

Que presenta

MARCOS EMMANUEL JASO VERA

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA
MOLECULAR**

Tutor:

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

México, D.F.

Agosto, 2015

Asesores:

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Profesor del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN

Dr. Santiago Martínez Calvillo

Profesor de la Unidad de Biomedicina de la FES-Iztacala, UNAM

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rebeca G. Manning Cela.

Durante el desarrollo de este trabajo, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Se agradece el apoyo de esta institución para el desarrollo de este trabajo y por el apoyo a la ciencia en México.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo marca el final de una etapa en la cual he aprendido mucho en muchos aspectos tanto profesionales como personales, permitiéndome crecer como profesionalista y como persona.

Quiero agradecer primeramente a la **Dra. Rebeca Georgina Manning Cela** por haberme dado la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por haberme guiado durante todo el transcurso del proyecto así como por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo. Quiero agradecerle por todo su esfuerzo y apoyo para poder llevar este proyecto a buen término a pesar de las dificultades presentadas por la distancia y comunicación.

Gracias a los Doctores **Nicolás Villegas Sepúlveda** y **Santiago Martínez Calvillo** por ser parte de mi comité de asesores así como por los consejos y el apoyo para el mejoramiento de este trabajo.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio: **Gabriel Noris** “Gabo”, **Itandehui Martínez** “Tere”, **Margarita Rubio** “Magui”, **Susan López** y **Alberto Santos** “Virus” por los buenos momentos en el laboratorio, sus enseñanzas y paciencia. Un especial agradecimiento a nuestra auxiliar **Claudia Márquez Dueñas** por los consejos experimentales, las pláticas amenas en el laboratorio, su dedicación y consejos para este trabajo.

A todos mis compañeros de la generación 2013-2015: **Carolina, Eduardo, Samuel, Luz, Rosalía, Korina, Sandra, Alfredo** y **Omar** por los buenos momentos compartidos durante las clases y fuera de ellas.

Un agradecimiento a mi familia y amigos que me apoyaron y animaron durante el trabajo en este proyecto y sus dificultades.

Finalmente quiero agradecer a todos aquellas personas que de alguna u otra manera estuvieron durante todo este trayecto, a todos ustedes... ¡Muchas Gracias!

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi familia, la gente que siempre me ha apoyado y ha creído en mí.

Se lo dedico a mi madre María Laura Vera Rosales, la persona que me ha enseñado lo que es el sacrificio por los que amas, me ha apoyado durante todo el desarrollo de este proyecto en las buenas y en las malas y que ha estado siempre al pendiente, cuidándome y animándome.

A mi padre Marcos Enrique Jaso Jáuregui, la persona que me ha enseñado lo que es el trabajo duro y a nunca darse por vencido. Sin él, mi elección de dedicarme a la ciencia jamás hubiera sido posible.

A mi hermano Pablo, por los buenos ratos y por hacerme olvidar los problemas con risas. Enseñándome que las cosas nunca son tan malas como parecen y que nunca es tarde para seguir tus sueños.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	3
Figura 2	Fases del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	5
Figura 3	Países con transmisión vectorial.	6
Figura 4	Signo de romaña durante la fase crónica de la infección con <i>T. cruzi</i> .	7
Figura 5	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> en el hospedero mamífero.	9
Figura 6	Modelos de invasión de <i>T. cruzi</i> a las células del hospedero.	11
Figura 7	Cinética de diferenciación extracelular de amastigotes a partir de tripomastigotes derivados de células en cultivo.	15
Figura 8	La amastigogénesis secundaria es acompañada por la expresión de la proteína de superficie de amastigotes Ssp4.	16
Figura 9	Representación esquemática del procedimiento de amplificación substractiva.	17
Figura 10	Transcripción relativa de clonas de la biblioteca de substracción en la forma intermedia de la amastigogénesis en comparación con su expresión en la forma de tripomastigote.	19

Figura 11	Expresión diferencial a nivel de transcrito de los genes XM_809939.1 y XM_800021.1 en forma intermedia de amastigogénesis con respecto a tripomastigote.	19
Tabla 1	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de interés.	33
Tabla 2	Homología de las proteínas codificadas por los genes <i>Tc53</i> y <i>Tc80</i> con proteínas en la base de datos del NCBI usando un análisis BLAST de astringencia baja.	43
Tabla 3	Homología de las proteínas codificadas por los genes <i>Tc53</i> y <i>Tc80</i> con proteínas de referencia en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , en la base de datos del NCBI usando un análisis BLAST de astringencia baja.	44
Tabla 4	Esquema representativo de la alineación de <i>Tc53</i> y <i>Tc80</i> con las proteínas encontradas por el análisis <i>in silico</i> .	45
Tabla 5	Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes <i>Tc53</i> y <i>Tc80</i> .	46
Figura 12	Transcripción de la secuencia antisentido en los parásitos AsTc53 y AsTc80.	50
Figura 13	Cuantificación de los niveles de transcrito de <i>Tc53</i> por qPCR en los <i>MOCK</i> y AsTc53.	52
Figura 14	Cuantificación de los niveles de transcrito de <i>Tc80</i> por qPCR en los <i>MOCK</i> y AsTc80.	53

Figura 15	Análisis <i>in silico</i> de los sitios putativos de <i>trans-splicing</i> de los genes <i>Tc53</i> y <i>Tc80</i> .	55
Figura 16	Curva de crecimiento de los epimastigotes <i>KD</i> de <i>Tc53</i> y <i>AsTc80</i> en comparación con los parásitos <i>MOCK</i> y los que expresan <i>GFP</i> .	58
Figura 17	Diferenciación extracelular de los parásitos <i>KD</i> de <i>Tc53</i> (<i>AsTc53</i>) y parásitos <i>AsTc80</i> en comparación con los parásitos control sin transfectar, <i>MOCK</i> y <i>GFP</i> .	59
Figura 18	Ensayo de metaciclogénesis de los parásitos <i>KD</i> de <i>Tc53</i> y <i>AsTc80</i> en comparación con los controles <i>MOCK</i> .	61
Figura 19	Diferenciación a tripomastigote metacíclico de los parásitos <i>KD</i> para <i>Tc53</i> (<i>AsTc53</i>) y los parásitos <i>AsTc80</i> en comparación con los controles <i>MOCK</i> al día 5 del experimento.	62
Figura 20	Niveles de transcrito de <i>GAPDH</i> en las distintas fases del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	83
Figura 21	Niveles de transcrito del gen de la proteína ribosomal L13 en las distintas fases del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	84

LISTA DE ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
Amp	Marcador de resistencia a Ampicilina.
ARN	Ácido ribonucleico.
AsTc53	Anti-sentido Tc53.
AsTc80	Anti-sentido Tc80.
CaCl₂	Cloruro de calcio.
CsCl	Cloruro de Cesio
DTU	<i>Discrete Typing Unit.</i>
DUF	Dominio de función desconocida.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli.</i>
EDTA	Etilendiamintetracetato.
FI	Forma intermedia.
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.
GFP	Proteína verde fluorescente.
HCl	Ácido clorhídrico.
KCl	Cloruro de potasio.
KD	<i>Knockdown.</i>
KO	<i>Knockout</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
MgCl₂	Cloruro de magnesio.
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio.

NCBI	National Center for Biotechnology Information.
Neo	Marcador de resistencia a Neomicina.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
PBS	Buffer salino de fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pNPP	Parafenil fosfato
RDE	Representación de la expresión diferencial
RT-qPCR	Retrotranscriptasa reversa seguida de PCR tiempo real.
SFB	Suero fetal bovino.
TAU	Medio orina artificial de triatomino (<i>Triatomine artificial urine</i>)
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA.
TE	Tris-EDTA.
TGF-α	Factor de crecimiento tisular alfa.
UTR	Región terminal no traducida (<i>Untranslated terminal region</i>).

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado, causante de la enfermedad de Chagas. Este parásito presenta diferentes estadios de desarrollo que se alternan entre el hospedero mamífero y el hospedero invertebrado, exponiéndose a diferentes condiciones micro-ambientales que inducen su diferenciación. A pesar de su importancia en la sobrevivencia del parásito y el establecimiento de la patogenia de la enfermedad, se conoce poco acerca de las moléculas que participan en el proceso de diferenciación de *T. cruzi* y de los mecanismos moleculares involucrados. En un trabajo previo, nuestro grupo describió condiciones *in vitro* que permitieron una diferenciación altamente sincrónica durante la amastigogénesis secundaria de *T. cruzi* y la obtención de diferentes formas intermedias (FIs) puras. Se obtuvo una biblioteca de substracción de una de estas FIs con respecto a tripomastigotes, encontrándose 39 transcritos que se expresan diferencialmente.

En este trabajo, se llevó a cabo la caracterización funcional de dos secuencias de la biblioteca, *Tc53* y *Tc80*, a través de la obtención de parásitos transfectantes estables que expresan las secuencias antisentido (AS) correspondientes. Por ensayos de RT-PCR tiempo final se demostró la expresión de las secuencias anti-sentido en los parásitos transfectados. Además, por RT-PCR tiempo real se demostró la obtención de parásitos *Knock down* (KD) de *Tc53*, que mostraron una reducción en su eficiencia de diferenciación de epimastigotes a amastigotes (61.2%), a tripomastigotes (31.3%) y a tripomastigotes metacíclicos (94.6%), con respecto a los parásitos mock. Contrario a lo esperado, los parásitos transfectados con el AS de *Tc80*, no mostraron una reducción en los niveles del transcrito de *Tc80*, mostrando por el contrario un aumento del 32%. Sin embargo, estos parásitos tuvieron un fenotipo deletéreo (desfase en crecimiento y disminución en un 40.1% en su capacidad de diferenciarse de epimastigotes a amastigotes con respecto a los parásitos mock), por lo que estudios futuros serán necesarios para dilucidar esto.

Los resultados anteriores junto con el análisis *in silico* de las secuencias de *Tc53* y *Tc80*, sugirieron que *Tc53* participa en la amastigogénesis y tripometacicloogénesis de *T. cruzi*, posiblemente a través de una función de unión a calcio o de metabolismo de grupos fosfato, mientras que *Tc80* aparentemente participa en la amastigogénesis del parásito posiblemente a través de una función relacionada al metabolismo de radicales de oxígeno en la mitocondria del parásito.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a hemoflagellate protozoan that is the causative agent of the Chagas disease. This parasite has different developmental forms that alternate between invertebrate and mammal hosts, exposing the parasite to different micro-environmental conditions that induce its differentiation. Despite its importance in the parasite survival and the establishment of the pathogenesis of the disease, little is known, about the participating molecules in the parasite differentiation process and the molecular mechanisms involved. In a previous work, our group described, in vitro conditions that allow a synchronous secondary amastigogenesis and the obtaining of different pure intermediate forms (IFs). In addition, we obtained a subtraction library of one of these IFs with respect to trypomastigotes, that allowed identify the differential expression of 39 different transcripts.

In this work it was carried out, the functional characterization of two sequences of the library, Tc53 and Tc80, through the obtaining of stable transfected parasites expressing the corresponding antisense sequences (AS). RT-PCR assays demonstrated the transcription of the anti-sense sequences in the transfected parasites. Besides, we also demonstrated the obtaining of Knockdown parasites (KD) of Tc53 by qRT-PCR that showed a reduced transformation efficiency from epimastigotes into amastigotes (61.2%), into trypomastigotes (31.3%) and into metacyclic trypomastigotes (94.6%) with respect to mock parasites. Unexpectedly, parasites transfected with the AS of Tc80, no showed a reduction in the level of Tc80 transcript and instead a 32% increase was observed. However, these parasites had a deleterious phenotype (delay in growth and 40.1% decrease in their differentiation efficiency from epimastigotes into amastigotes in comparison with mock parasites); therefore, future studies will be necessary to elucidate this.

These results, together with the in silico analysis of Tc53 and Tc80, suggested that Tc53 participates in the amastigogenesis and trypometaciclogenesis of the parasite, possibly through a calcium binding function or phosphate groups metabolism; whereas, Tc80 apparently participates in the parasite amastigogenesis,

possibly through a function related to the metabolism of oxygen radicals in the mitochondria of the parasite.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE	X
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 ANTECEDENTES GENERALES.	2
1.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .	2
1.1.2 La enfermedad de chagas.	5
1.1.3 Infección intracelular de <i>T. cruzi</i> en vertebrados.	8
1.1.4 Diferenciación celular.	11
1.1.5 Amastigogénesis.	12
1.2 ANTECEDENTES DIRECTOS.	14
2. JUSTIFICACIÓN.	20
3. HIPÓTESIS.	22

4. OBJETIVO GENERAL.	24
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	28
7. RESULTADOS.	41
8. DISCUSIÓN.	63
9. CONCLUSIONES.	70
10. PERSPECTIVAS.	72
11. BIBLIOGRAFÍA.	74
12. ANEXO.	82

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 ANTECEDENTES GENERALES.

1.1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoario flagelado que tiene un ciclo de vida digénico basado en su presencia en 2 hospederos. Un hospedero invertebrado redúvido, donde se llevan a cabo dos fases de su ciclo de vida, el epimastigote y el tripomastigote metacíclico; y un hospedero mamífero, donde se llevan las otras 2 fases de su ciclo de vida, el amastigote y el tripomastigote sanguíneo (Figura 1).

El parásito, fue descubierto en 1910 por el biólogo brasileño Carlos Chagas al examinar el intestino del insecto vector *Triatoma infestans*, conocido comúnmente con el nombre de vinchuca o chinche besucona.

Este protozoario pertenece al grupo de los cinetoplástidos, ya que contiene una única mitocondria especializada llamada "cinetoplasto". Este organelo contiene material genético de dos tipos (minicírculos y maxicírculos) que en conjunto participan en el proceso de edición de los ARN mensajeros mitocondriales en el parásito. Los minicírculos, tienen las secuencias que codifican los ARN guías para la modificación por adición y delección de uridinas de los ARN mensajeros provenientes de los maxicírculos. Los maxicírculos contienen los genes mitocondriales correspondientes a los citocromos [Lukes y col., 2002].

Entre otras peculiaridades de los cinetoplástidos, se encuentra la organización de su genoma en unidades policistrónicas, y la carencia de *cis-splicing* y regulación transcripcional. Por lo tanto, la regulación genética en los tripanosomátidos es principalmente postranscripcional, a nivel de eficiencia de *trans-splicing*, poliadenilación y regulación traduccional [Kramer, 2012]. Aunado a esto, este grupo de protozoarios tiene la glicolisis compartimentalizada en "glicosomas" [Simpson y col., 2006].

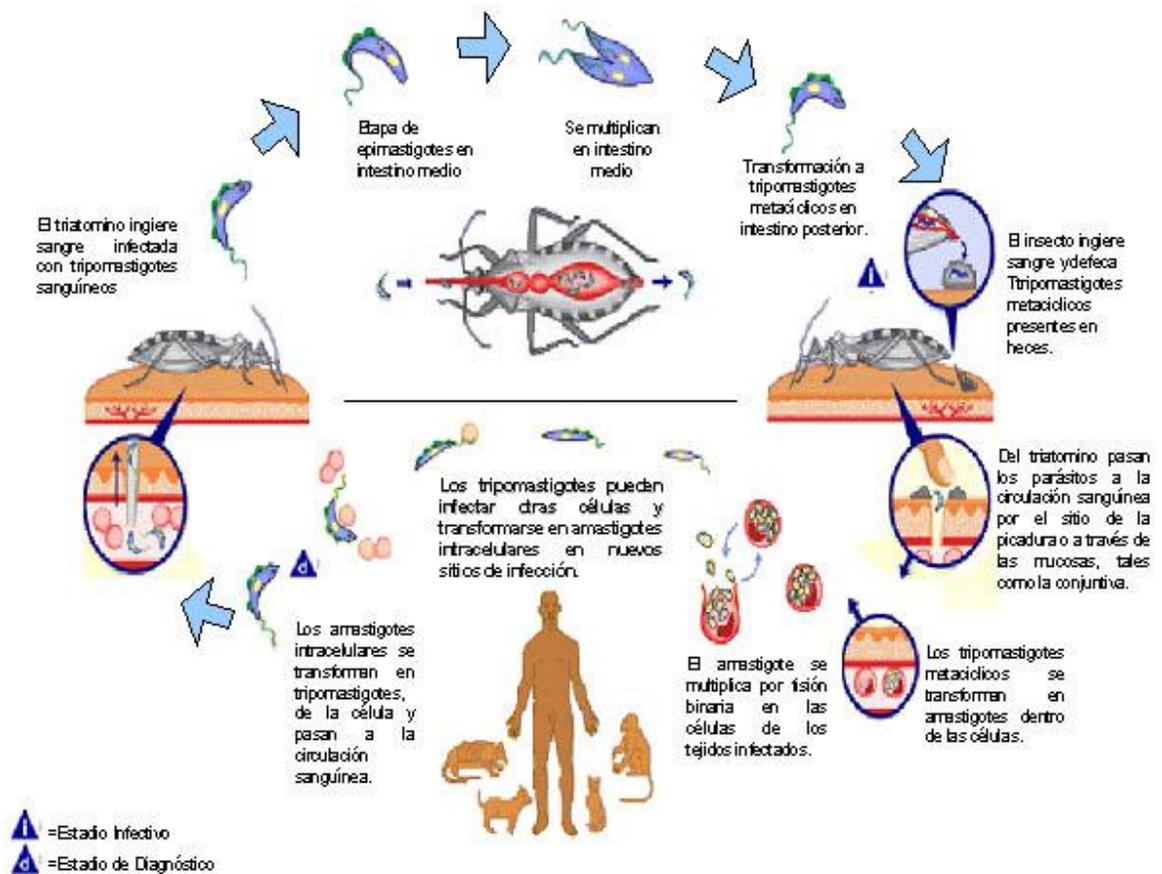


Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi* [Tomado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/cruzi.html>].

Específicamente, *T. cruzi* es un protozoario complejo con una gran variabilidad genética y bioquímica entre miembros de la misma especie. Esta variabilidad ha permitido clasificarlo en 6 *DTUs* (por sus siglas en inglés *Discrete Typing Unit*) que están distribuidos en América Latina y que varían en infectividad, hospedero vector e inclusive en tamaño genómico [Zingales y col., 2009].

De forma general, las fases de su ciclo de vida son las siguientes:

Tripomastigote metacíclico: El tripomastigote metacíclico es la forma infecciosa del parásito para el hospedero mamífero, no tiene capacidades replicativas pero tiene la capacidad de infectar rápidamente al hospedero mamífero. Esta fase del parásito es excretada en las heces del triatomino y entra a su hospedero mamífero

por medio de la herida de la picadura del insecto, escoriaciones en la piel o mediante la penetración de mucosas intactas. Morfológicamente es más delgado y largo que el epimastigote y su cinetoplasto se encuentra en la parte posterior del cuerpo del parásito.

Amastigote: El amastigote es la fase intracelular en el hospedero mamífero, tiene capacidades replicativas e infectivas [Florencio-Martínez y col. 2010] y si es liberado al torrente sanguíneo tiene capacidad de llevar cabo la invasión celular en células adyacentes al sitio de infección. Morfológicamente es esférico, su cinetoplasto se encuentra en la parte anterior cercana al núcleo y su flagelo es pequeño.

Tripomastigote sanguíneo: El tripomastigote sanguíneo es una fase no replicativa e infectiva tanto para el triatomino como para el mamífero y tiene una morfología muy similar a la del tripomastigote metacíclico. La diferencia principal que tiene con este último es que se diferencia a partir de amastigotes, mientras el tripomastigote metacíclico lo hace a partir de epimastigotes (Figura 2).

Epimastigote: El epimastigote es la fase del parásito con capacidades replicativas y que se desarrolla en el intestino del triatomino. Es de forma alargada y posee un flagelo anterior. Su cinetoplasto se encuentra anterior al núcleo. Aun cuando por muchos años se consideró una fase no infectiva, trabajos recientes han mostrado que es capaz de infectar células en cultivo [Florencio-Martínez y col., 2010].

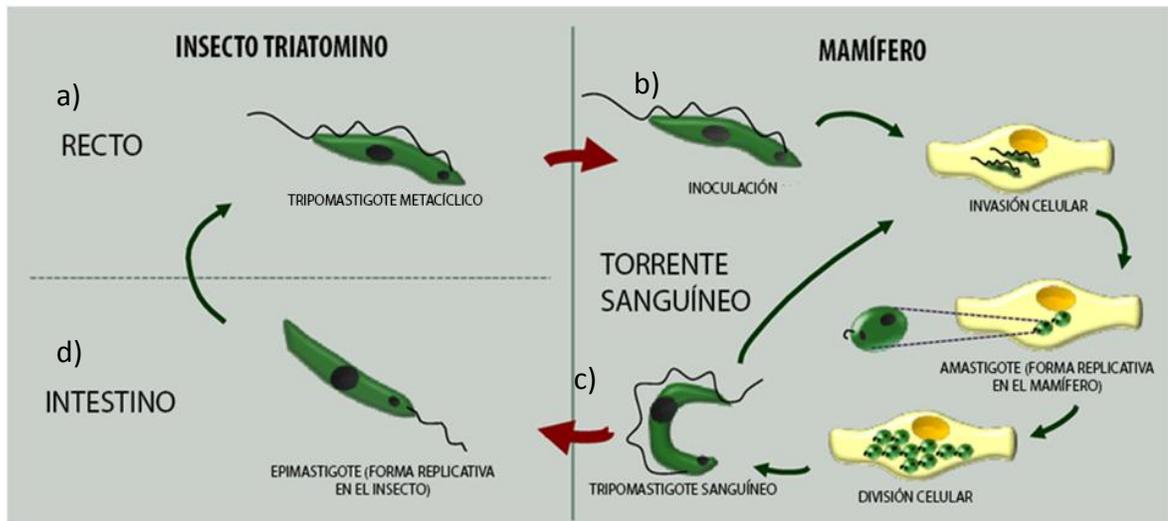


Figura 2. Fases del ciclo de vida de *T. cruzi*. El ciclo de vida del parásito consta de 4 formas: a) Tripomastigote metacíclico, b) Epimastigote, c) Amastigote y d) Tripomastigote sanguíneo [Brennan y colaboradores, 2012; Teixeira y colaboradores, 2006].

1.1.2 La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria causada por el protozooario cinetoplástico hemoflagelado *T. cruzi*. Este parásito es transmitido al humano por algunas especies específicas de insectos del grupo de los triatóminos y sus medios principales de transmisión son por la inoculación debida a la contaminación de la herida con heces del insecto infectado o por medio de ingesta. Esta parasitosis se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América hasta la Patagonia Argentina y sus hospederos han sido reportados principalmente en Latinoamérica (Figura 3) [OPS, 2014]. Esta enfermedad afecta principalmente a grupos socioeconómicos de bajos recursos, debido tanto a la naturaleza de su vivienda como a la carencia de un control de plagas en esas localidades.

Sin embargo, no es una enfermedad restringida al continente americano, ya que se han reportado casos en Europa y Australia debido a personas infectadas que migran fuera de Latinoamérica. Esto representa un riesgo potencial de

transmisión, ya que estos individuos infectados pueden transmitir la infección por medios alternos como: trasplante de órganos, donación sanguínea y vía transparentaría [OPS, 2014].

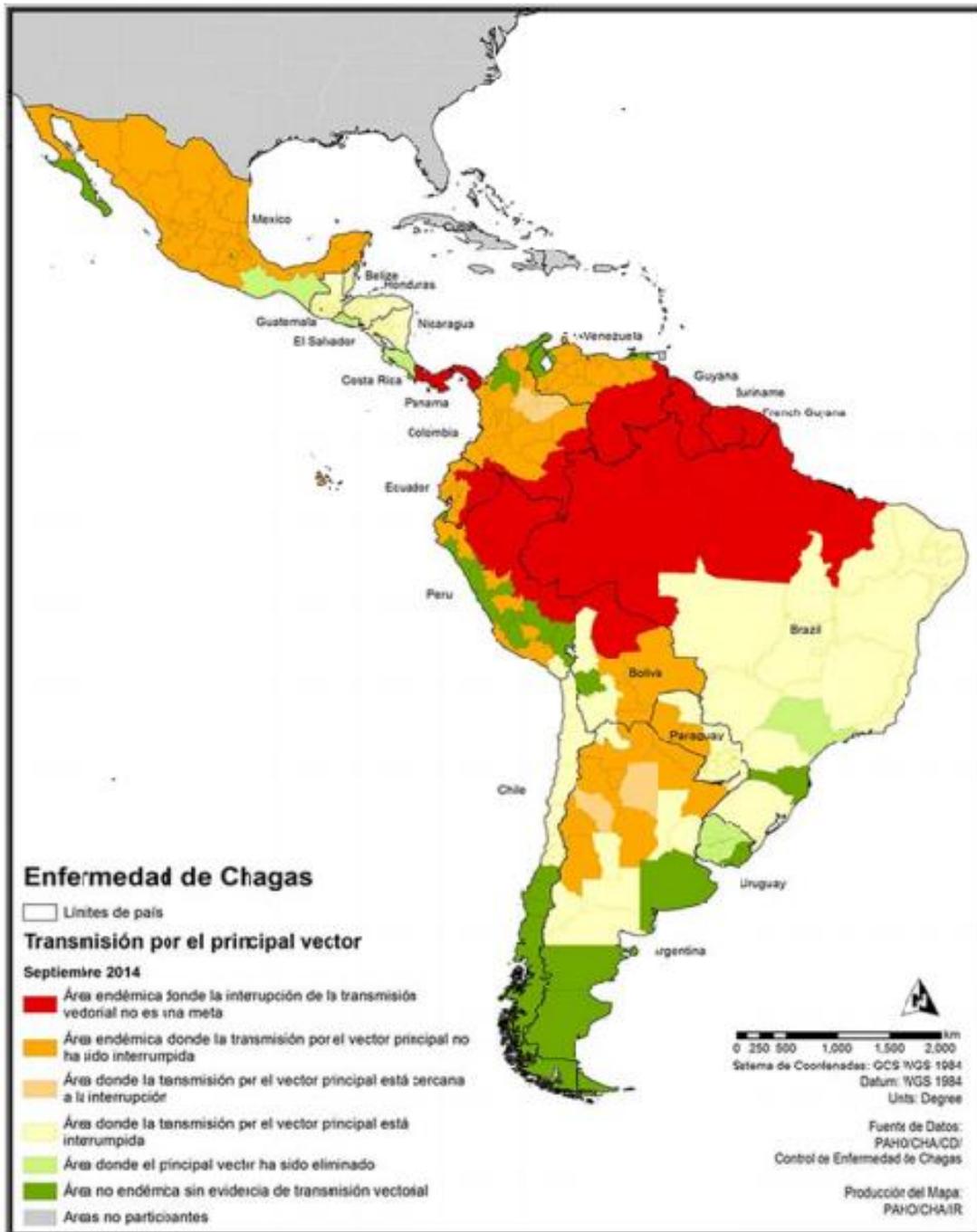


Figura 3. Países con transmisión vectorial [OPS, 2014].

El agente etiológico fue descubierto en fauna silvestre, tanto en el vector insecto como en un gato doméstico y posteriormente Carlos Chagas lo detectó en pacientes. Además, estudios de paleoparasitología revelan la convivencia del humano con este parásito desde hace más de 9000 años en Chile y Perú [Aufderhelde y colaboradores, 2003].

La tripanosomiasis americana es una enfermedad que presenta dos fases:

- Fase aguda: En esta forma de la parasitosis, el paciente tiene sintomatología variables, siendo muy comunes la fiebre, debilidad, diarrea, edema y dolor articular. La fase aguda de la enfermedad es la principal fase de detección de la enfermedad, ya que es cuando el protozoo se encuentra en circulación sanguínea y por lo tanto puede ser detectado con un simple frotis. Si la inoculación del parásito fue realizada por una inoculación de heces en la picadura del hospedero triatomino, en la mayoría de los casos se desarrolla una reacción inflamatoria fuerte en el sitio de la picadura. Esta reacción es llamada “signo de romaña”, cuando el sitio de inoculación es en la conjuntiva ocular, o “chagoma” cuando el sitio de inoculación fue en cualquier otro lugar del cuerpo (Figura 4) [Teixeria y colaboradores, 2006].



Figura 4. Signo de romaña durante la fase crónica de la infección con *T. cruzi*. Cuando la inflamación se presenta en este sitio específicamente, se le llama “signo de romaña” [Imagen del CDC: http://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/vectors/].

- Fase crónica: Es la fase avanzada de la enfermedad que se subdivide en 2 etapas. 1) La etapa crónica asintomática, caracterizada por la desaparición de los signos y síntomas y en la que se ha propuesto que el parásito se aloja en las células musculares, aparentemente evadiendo así la respuesta inmunológica. Y 2) la etapa crónica sintomática, en la que el parásito extiende su invasión a músculo cardíaco y esófago. En esta fase, el parásito causa afecciones cardíacas y digestivas por el crecimiento del corazón y esófago. Se ha propuesto que lo anterior es resultado de una respuesta autoinmune y a la inserción del material genético presente en los minicírculos del cinetoplasto al genoma del hospedero [Teixeria y col., 2006]. Sin embargo, en estudios posteriores se propone que la fisiopatogenia de la enfermedad es debida a que además de una constante presencia del parásito, existe mimetismo molecular coexistente con pérdida de la inmunorregulación y como resultado de ambas, se produce una atrofia a nivel de los plexos mientéricos del tracto digestivo así como al sistema de conducción del corazón, lo cual tiene como efecto final la aparición de las diversas manifestaciones de la enfermedad de Chagas [Tarleton, 2003; Kierszenbaum, 1999 y Bonney y Engman, 2008].

1.1.3 Infección intracelular de *T. cruzi* en vertebrados.

En vertebrados, *T. cruzi* tiene la capacidad de perpetuar la infección a través de la invasión celular, mediante tripomastigotes sanguíneos y amastigotes [Ley y col., 1988]. Los amastigotes al entrar a la célula del hospedero inician su ciclo replicativo (Figura 5), mientras que los tripomastigotes sanguíneos al entrar a la célula del hospedero llevan a cabo primero un proceso de diferenciación a amastigotes llamado amastigogénesis.

Durante el proceso de invasión celular, el parásito es protegido de la respuesta inmunológica humoral y se ha observado que sus capacidades de crecimiento son incrementadas mediante la presencia de citocinas como TGF- α

[Ferrão y colaboradores, 2012]. Cabe mencionar, que el amastigote tiene capacidades de control celular, de tal forma que evita la reacción celular contra la invasión.

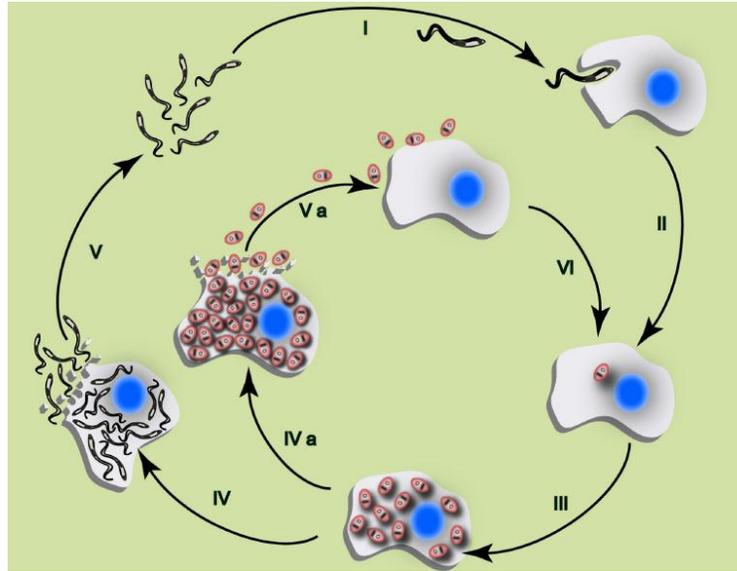


Figura 5. Ciclo de vida de *T. cruzi* en el hospedero mamífero. I) Invasión del tripomastigote sanguíneo a una célula sana del hospedero vertebrado, II) diferenciación de tripomastigote a amastigote en el citoplasma celular, III) replicación del amastigote en la célula, IV) diferenciación de los amastigotes a tripomastigotes sanguíneos, IVa) rompimiento de la célula por una sobrecarga de amastigotes, V) liberación de tripomastigotes sanguíneos a la sangre, Va) liberación de amastigotes al torrente sanguíneo y VI) invasión de una célula sana del hospedero vertebrado por un amastigote [Fernandes y Andrews, 2012].

De forma general, la entrada del parásito a la célula del hospedero (ya sea en forma de tripomastigote sanguíneo o tripomastigote metacíclico) se ha visto que puede estar basada en el daño a la membrana de la célula blanco. Esto activa los mecanismos de reparación celular, principalmente mediados por localización de ceramida en el sitio de daño y cascadas de calcio, permitiendo así la internalización del parásito. Sin embargo, también se ha observado una vía dependiente de actina y una tercera vía basada en la acumulación del segundo mensajero celular PIP_3 , en la cual la internalización del parásito no requiere la modificación del citoesqueleto. De esta forma, el parásito puede entrar ya sea en una vacuola o endosoma a la

célula. Este endosoma madura con una disminución de pH al unirse a lisosomas, lo cual dispara los procesos moleculares de la amastigogénesis (diferenciación de tripomastigotes a amastigotes) e induce los mecanismos para la liberación del parásito al citoplasma (Figura 6) [Espinoza y Manning-Cela, 2007; de Souza y col., 2010 y Fernandes y Andrews, 2012].

Se ha reportado que los amastigotes llevan a cabo el proceso de invasión por vías dependientes de actina y detonan vías de señalización diferentes a las activadas por los tripomastigotes [revisado en Espinoza y Manning-Cela, 2007].

Después de diferenciarse el tripomastigote a amastigote, en promedio lleva a cabo 9 rondas de replicación intracelular, diferenciándose nuevamente a tripomastigote sanguíneo y saliendo de la célula hospedera por procesos no apoptóticos tras la destrucción de la célula infectada. Estos parásitos liberados son formas móviles que inician un nuevo proceso de invasión celular en células aledañas o expanden la infección a otros tejidos [Fernandes y Andrews, 2012].

En el caso del proceso de invasión por amastigotes, se ha reportado que estos parásitos entran directamente a la fase de replicación celular después de la invasión de la célula blanco. Dependiendo de la infectividad de la cepa y el tipo de célula blanco infectada, el parásito puede matar a la célula antes de su diferenciación a tripomastigote, liberando amastigotes (que llevan a cabo un sub-ciclo alternativo de infección) o diferenciarse a tripomastigotes continuando con el proceso antes descrito [Espinoza y Manning-Cela, 2007].

Se ha propuesto que la capacidad de invasión a nuevas células, la velocidad de diferenciación e incluso la progresión de la enfermedad, dependerán del *DTU* de *T. cruzi* que este infectando al paciente y del sistema inmunológico del mismo [Zingales y col., 2009].

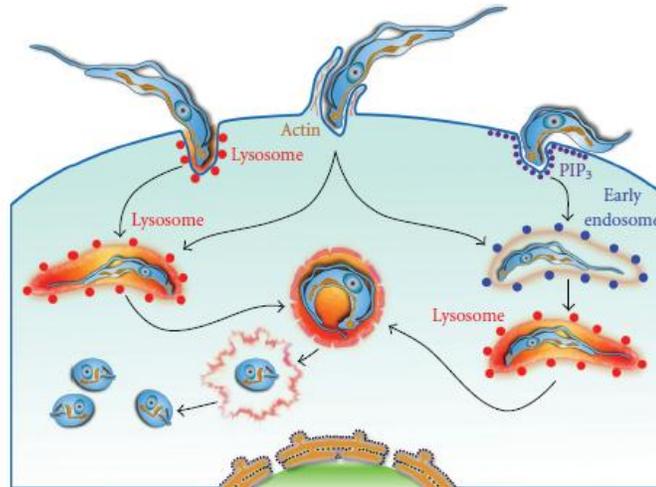


Figura 6. Modelos de invasión de *T. cruzi* a las células del hospedero. De izquierda a derecha se observa primero el mecanismo de daño de membrana, posteriormente el dependiente de actina y por último el mecanismo de entrada por señalización por PIP₃ [de Souza y colaboradores, 2010].

1.1.4 Diferenciación celular.

T. cruzi es un parásito que durante su ciclo de vida lleva a cabo la diferenciación a diversas formas celulares que le confieren de resistencia y ventaja en el ambiente en el que se está desarrollando en los distintos hospederos (Figura 2). Estos cambios en la morfología y metabolismo celular, son disparados por el cambio de las características del medio ambiente, que resultan en la diferenciación progresiva y secuencial del parásito a lo largo de su ciclo de vida [Navarro y col., 2003 y Hernandez-Osorio y col., 2010].

De forma general, existen dos tipos de diferenciación celular en el parásito a las que se les ha dado mayor importancia: la metaciclogénesis y la amastigogénesis. La metaciclogénesis es la formación de tripomastigotes metacíclicos a partir de epimastigotes en el tracto intestinal del hospedero reduído [Minning y col., 2009]. La amastigogénesis es el cambio de tripomastigote a amastigote dentro de las células del hospedero vertebrado.

Estos cambios morfológicos también conllevan un cambio en la regulación tanto a nivel postranscripcional como traduccional [Nardelli y col., 2007; y Minning y col., 2009] e inclusive cambios a nivel de cadena respiratoria en la mitocondria [Tyler y col., 2003].

Se ha demostrado que hay una disminución en la síntesis de ribosomas y síntesis de glicoproteínas específicas de tripomastigotes en la amastigogénesis, que como se dijo anteriormente, es la fase no replicativa del parásito [Nardelli y col., 2007]. Estas glicoproteínas de tripomastigote pueden variar entre las fases del tripomastigote metacíclico y el tripomastigote sanguíneo, como es el caso de la familia gp85, cuya presencia / ausencia puede determinar la capacidad invasiva del parásito [de Souza y colaboradores, 2010].

1.1.5 Amastigogénesis.

La amastigogénesis es el proceso de diferenciación de tripomastigotes a amastigotes. Cuando este proceso se lleva a cabo a partir de tripomastigotes metacíclicos provenientes de un hospedero reducido, se denomina amastigogénesis primaria, mientras que cuando es a partir de tripomastigotes sanguíneos provenientes de una célula infectada, se denomina amastigogénesis secundaria [Navarro y col., 2003].

El proceso es iniciado en la vacuola parasitófora, donde se ha propuesto que la disminución de pH dispara el inicio de la diferenciación del parásito [Hernández-Osorio y col., 2010]. También se ha descrito que el escape del parásito de la vacuola parasitófora es mediado por la secreción de transialidasas y proteínas formadoras de poros en membrana como LYT1, que facilitan el rompimiento de la vacuola parasitófora y la salida del parásito al citoplasma celular [Lugo-Caballero y col., 2013].

El sitio de inicio de la diferenciación morfológica varía según la célula que haya sido infectada, pero este proceso se puede dar inmediatamente tras la acidificación de la vacuola parasitófora o durante la salida de la misma [Navarro y col., 2003]. Se ha observado que posterior a su diferenciación morfológica con una

variación de tiempo de 2 a 8 horas *in vivo*, los amastigotes permanecen en una fase lag durante aproximadamente 35 horas. Se sugiere que este tiempo es el necesario para que se lleve una completa transformación del tripomastigote que entró a la célula al amastigote [Devorak, 1975].

Entre las características moleculares que se conocen de este proceso de diferenciación, se ha visto que el proteosoma es esencial para el re-arreglo del citoesqueleto del parásito [Gonzales y col., 2007]. Se ha descrito la dependencia de proteasas, un aumento en la expresión de las ARN polimerasas, un cambio en la regulación de histonas y en la regulación epigenética del parásito [Manning-Cela y col., 2006]; así como un cambio en la morfología de su cinetoplasto [Cavalcanti y col., 2009] y aunque no se ha comprobado que el cinetoplasto tenga un papel vital durante la diferenciación de *T. cruzi*, se ha visto que es necesario para la diferenciación en los tripanosomas africanos [Timms y col., 2002].

1.2 ANTECEDENTES DIRECTOS.

Estudios sobre amastigogénesis secundaria han permitido determinar que la diferenciación del parásito es un proceso progresivo y continuo en el que se producen “subfases” o “formas intermedias” (FI) [Hernández-Osorio y col., 2010]. Estas formas intermedias se han definido como la morfología celular del parásito que se obtiene a través del tiempo después del inicio de la amastigogénesis.

Este proceso varía en su velocidad entre los diversos *DTUs* de *T. cruzi*, entre cepas del parásito e inclusive entre las distintas fases de tripomastigotes que presenta el parásito. El tripomastigote metacíclico, tiene una capacidad mayor de invasión y una velocidad mayor de diferenciación (amastigogénesis primaria) en comparación con el tripomastigote sanguíneo (amastigogénesis secundaria) [Navarro y col., 2003].

Las FI más tempranas presentan una morfología similar a la del tripomastigote, mientras que las FI tardías tienen una similitud mayor con los amastigotes. A través de los estudios de estas formas intermedias, se ha podido llevar a cabo la caracterización de los cambios morfológicos que lleva a cabo el parásito (Figura 7). Estos cambios morfológicos se caracterizan por el redondamiento del cuerpo del parásito, desaparición del flagelo, reposicionamiento del cinetoplasto y redondamiento del núcleo [Hernández-Osorio y col., 2010].

A pesar de que se ha avanzado en la caracterización de las FI obtenidas durante la amastigogénesis secundaria, la información de las moléculas participantes y los procesos moleculares involucrados es escasa. En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar estos mecanismos moleculares, por lo que en trabajos previos obtuvimos una biblioteca de sustracción de FI obtenida durante la amastigogénesis secundaria, en comparación con tripomastigotes. Se eligió la forma intermedia de 3 horas de la amastigogénesis, ya que carece de la morfología del tripomastigote y aún no expresa marcadores moleculares *Ssp4* específicos de amastigote (Figura 8). Por lo tanto, consideramos a esta FI como la más adecuada para la construcción de una biblioteca de sustracción, el estudio de la amastigogénesis en *T. cruzi* y para poder llevar a cabo la identificación y

caracterización de proteínas que se estén regulando durante el proceso de diferenciación [Hernández-Osorio y col., 2010].

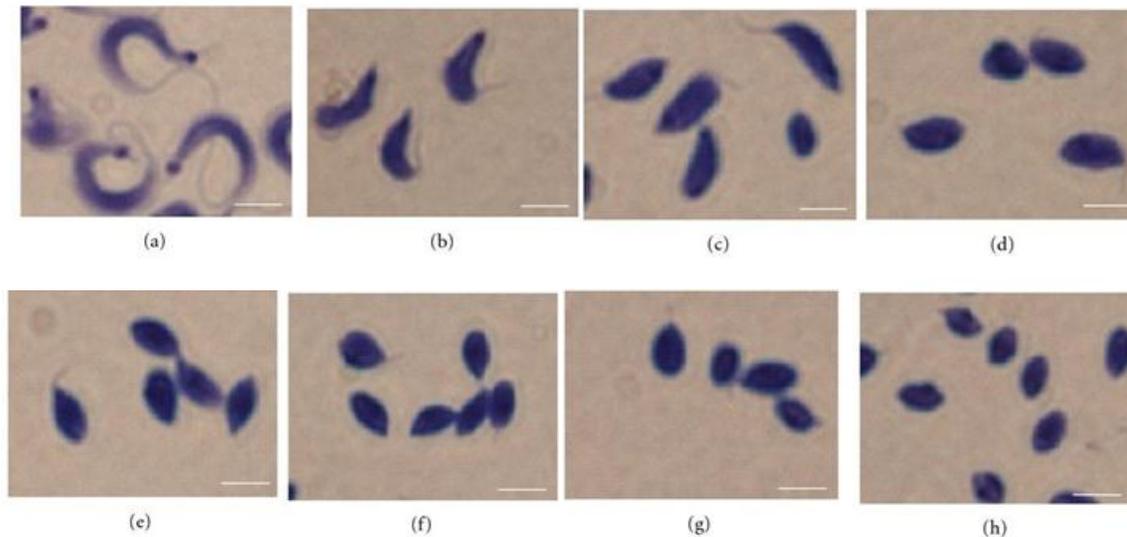


Figura 7. Cinética de diferenciación extracelular de amastigotes (h) a partir de tripomastigotes (a) derivados de células en cultivo. Se observan las formas intermedias de 1 hora (b), 2 horas (c), 3 horas (d), 4 horas (e), 5 horas (f) y 6 horas (g). La barra blanca representa 25 micrómetros [Hernández-Osorio y colaboradores, 2010].

Para la obtención de la biblioteca de sustracción, se utilizó la técnica de “Representación de la Expresión Diferencial” (RDE). Esta estrategia se basa en la amplificación por *PCR* de secuencias de ADNc correspondientes a una población celular (muestra / formas intermedias) después de la hibridación sustractiva con secuencias de ADNc de una población estrechamente relacionada (conductora / tripomastigotes), utilizando condiciones de alta astringencia. Para ello se realizaron tres ciclos de sustracción y amplificación utilizando una proporción 1/10, 1/100 y 1/1000 de ADNc de FI / tripomastigotes, utilizando para cada ronda diferentes adaptadores. Como resultado se obtuvieron 10 diferentes productos de sustracción en un rango de 200 a 2000 pb, representando los transcritos que se expresan diferencialmente en la FI durante la amastigogénesis secundaria de *T. cruzi* (Figura 9) [Krieger y Goldenberg, 1998]. Con estos productos se construyó una biblioteca

de sustracción. Posteriormente, se analizó una alícuota de ésta, determinando la presencia 83 clonas que se expresan diferencialmente utilizando la técnica de *dot-blot*. Para ello, en la membrana de Nylon se goteó el ADN de cada clona y se hibridó con el ADNc de tripomastigotes, FI o amastigotes marcados radioactivamente, utilizando condiciones de hibridación y lavado de alta astringencia.

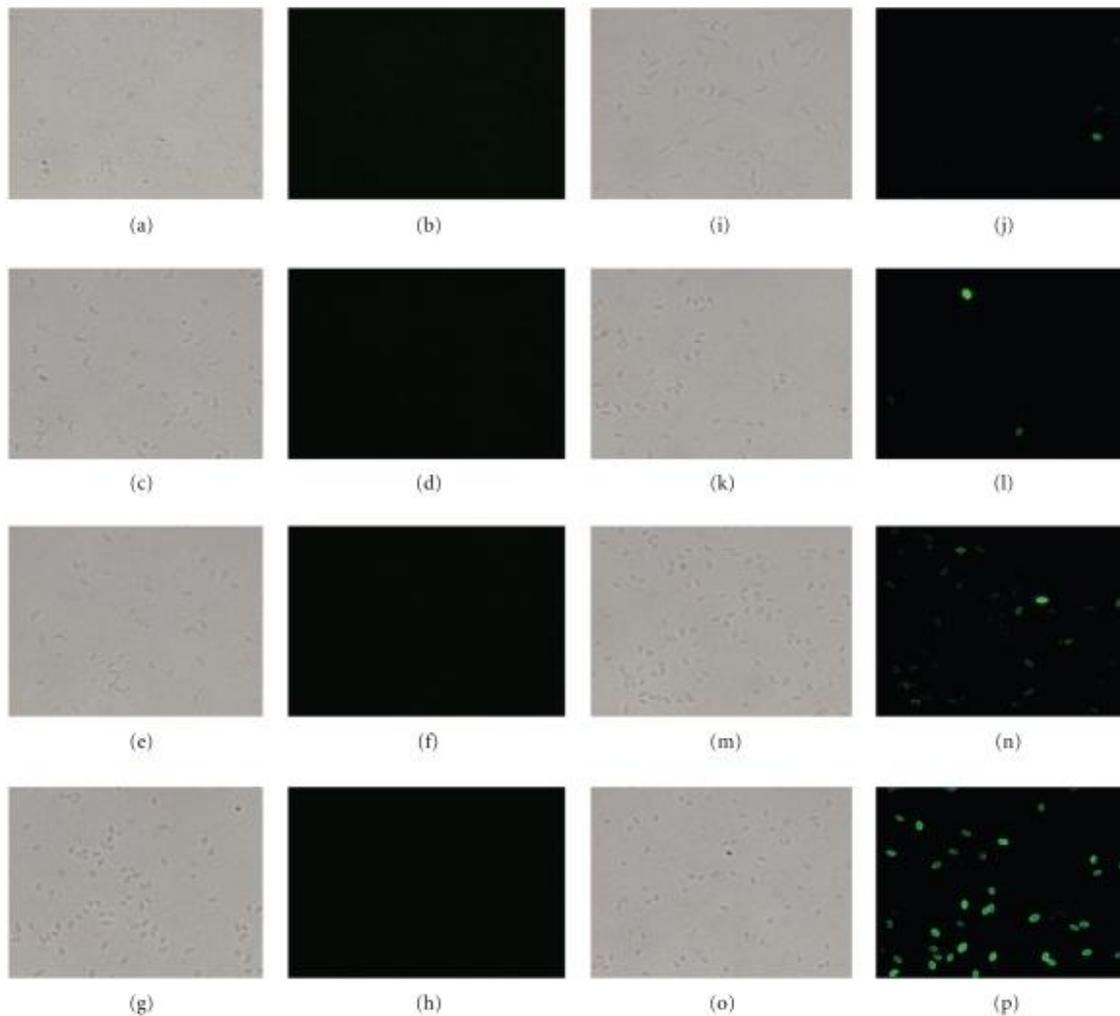


Figura 8. La amastigogénesis secundaria es acompañada por la expresión de la proteína de superficie de amastigotes Ssp4. El análisis de la expresión de Ssp4 se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta en tripomastigotes (a, b), formas intermedias de 1 hora (c, d), 2 horas (e, f), 3 horas (g, h), 4 horas (i, j), 5 horas (k, l), 6 horas (m, n) y amastigotes (o, p). Los paneles del lado derecho corresponden a la inmunofluorescencia y los del lado izquierda a microscopía de luz [Hernández-Osorio y colaboradores, 2010].

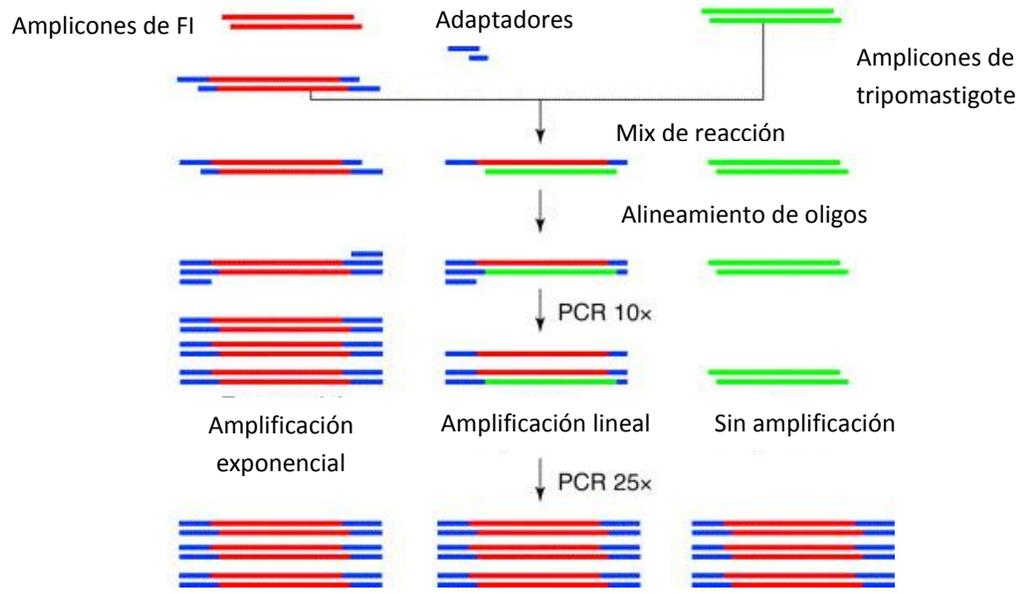


Figura 9. Representación esquemática del procedimiento de amplificación substractiva. Los ADNc de la forma intermedia (en rojo) son marcados con los adaptadores (azul) y se lleva a cabo una amplificación en presencia del ADNc de tripomastigotes (verde) [Modificado de Krieger y Goldenberg, 1998].

El ADN de las 83 clonas fue secuenciado y los resultados fueron analizados *in silico*, determinando 39 moléculas diferentes, de las cuales 26 secuencias corresponden a proteínas hipotéticas, 8 secuencias contienen dominios conservados de proteínas ya reportadas y 5 secuencias contienen dominios conservados de proteínas pertenecientes a la familia de transialidasas [Sánchez-Cruz, tesis de doctorado].

El interés de nuestro grupo es la caracterización de todas las clonas de la biblioteca. Se ha iniciado el estudio de todas aquellas clonas que además de mostrar una expresión diferencial (Figura 10), también tienen homología con proteínas con función conocida relacionada con procesos de diferenciación en otros sistemas. También ya se encuentra en estudio otras secuencias clasificadas como hipotéticas en los bancos de datos del parásito.

En este trabajo, siguiendo con la caracterización de las clonas restantes, elegimos trabajar con los genes correspondientes a las clonas C53 y C80. Como se

dijo anteriormente, estos genes están clasificados como secuencias correspondientes a proteínas hipotéticas en el banco de datos de *T. cruzi* y bancos generales. No se encontraron secuencias que conservaran una alta homología con ninguna proteína ya reportada, ni dominios con función conocida en las proteínas codificadas por estos genes. También se encontró que el gen correspondiente a C80 es multicopia y el gen correspondiente a C53 es de copia única (acceso XM_809939.1 en el NCBI y TcCLB.506337.130 en TriptrypDB). La copia del gen específico que nosotros elegimos estudiar de C80 es aquel con la clave de acceso TCCLB.503395.20 en la base de datos de TritrypDB y XM_800021.1 en la base de datos del *NCBI*, ya que es el que guarda una homología mayor con la clona C80; la otra copia tienen el número de acceso TCCLB.506181.30 en TritrypDB y XM_808751.1 en el *NCBI* y conserva una homología del 98%. Ambas clonas se expresan diferencialmente en la forma intermedia en comparación con los tripomastigotes, evaluado tanto en los ensayos de *dot-blot* iniciales, como en los estudios confirmatorios posteriores evaluados mediante *RT-PCR* tiempo real (Figura 11).

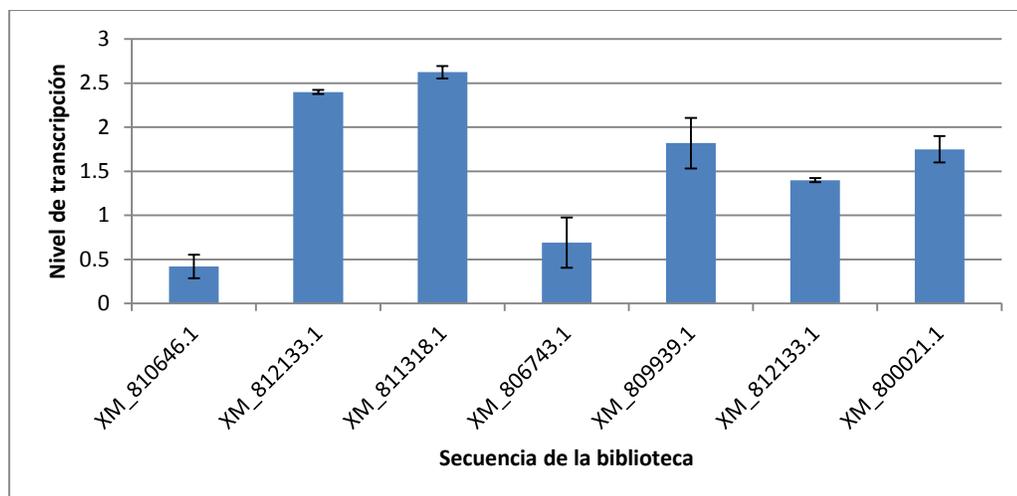


Figura 10. Transcripción relativa de una muestra representativa de las clonas de la biblioteca de sustracción en la forma intermedia de la amastigogénesis en comparación con su expresión en la forma de tripomastigote. XM_810646.1 corresponde a la secuencia de la clona 3. XM_812133.1 corresponde a la secuencia de la clona 22, XM_811318.1 corresponde a la secuencia de la clona 49. XM_806743.1 corresponde a la secuencia de la clona 52. XM_809939.1 corresponde a la secuencia de la clona 53 (*Tc53*). XM_812133.1 corresponde a la secuencia de las clonas 44 y 54. XM800021.1 corresponde a la secuencia de la clona 80 (*Tc80*). El nivel de expresión 1, representa la transcripción de la secuencia en tripomastigote.

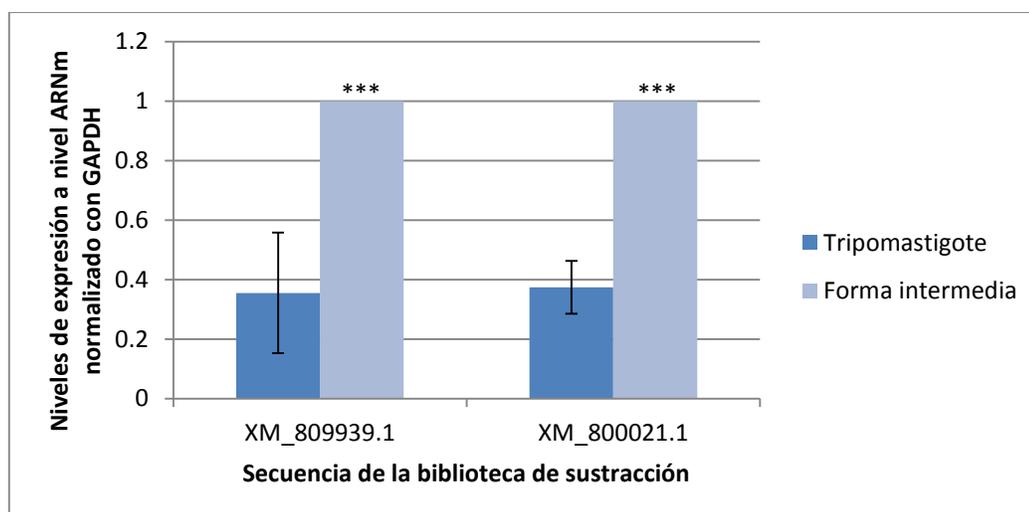


Figura 11. Expresión diferencial a nivel de transcrito de los genes XM_809939.1 (*Tc53*) y XM_800021.1 (*Tc80*) en la forma intermedia de amastigogénesis con respecto a tripomastigote. n = 4. ***: $P \leq 0.001$

2. JUSTIFICACIÓN.

La amastigogénesis es un proceso determinante en el ciclo de vida de *T. cruzi* y el establecimiento de la patogenia de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, se conoce poco de las proteínas participantes y de los mecanismos moleculares involucrados. Por lo tanto, es necesario realizar estudios dirigidos para la identificación y caracterización de las proteínas que participan en el proceso de amastigogénesis del parásito.

3. HIPÓTESIS.

Los productos de los genes *Tc53* y *Tc80* de la biblioteca de sustracción de *T. cruzi*, obtenida de la forma intermedia de la amastigogénesis con respecto al tripomastigote; participan en el proceso de diferenciación del parásito.

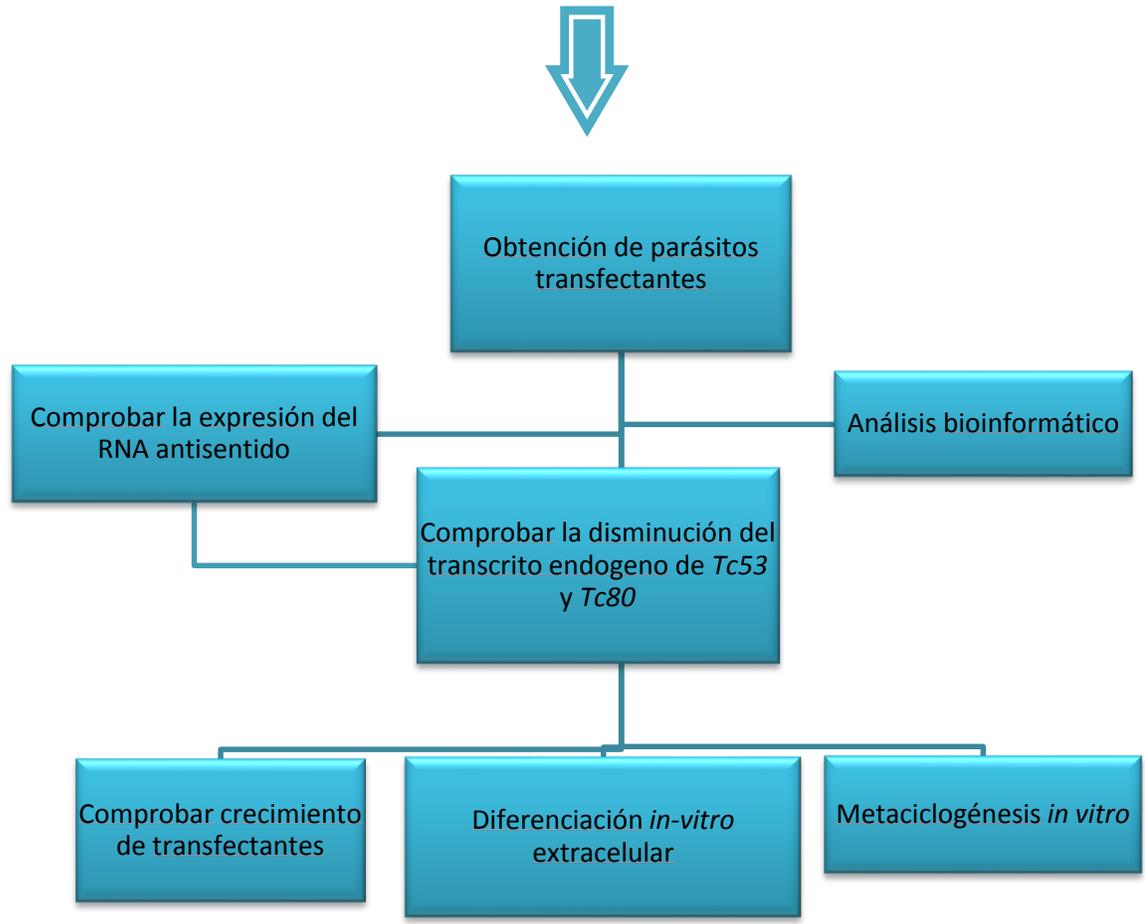
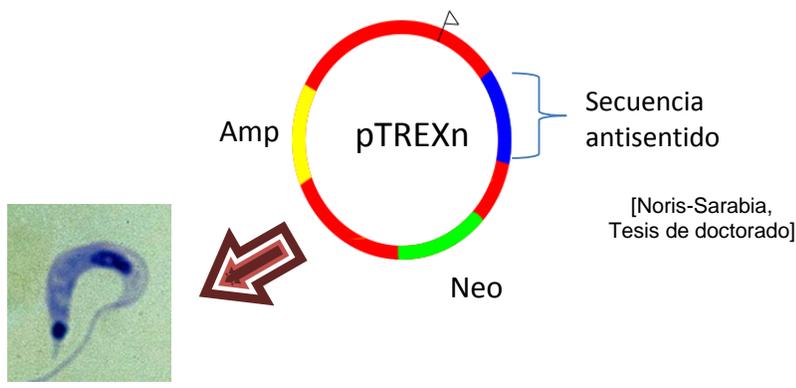
4. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar molecularmente a Tc53 y Tc80 de *T. cruzi*.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Realizar un análisis bioinformático de las secuencias de Tc53 y Tc80.
2. Obtener parásitos transfectantes estables, que expresen secuencias antisentido para *Tc53* y *Tc80* y parásitos *MOCK*.
3. Demostrar la obtención de parásitos *Knockdown (KD)* de *Tc53* y *Tc80* por *qRT-PCR*.
4. Evaluar la capacidad de crecimiento de los parásitos *KD* en comparación con parásitos control (*MOCK*).
5. Evaluar la capacidad de diferenciación de los parásitos *KD* y *MOCK*.
 - a) *In vivo* en transformación extracelular de parásitos *KD* y *MOCK* en infecciones en fibroblastos 3T3 NIH.
 - b) *In vitro* en metaciclogénesis.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Parásitos.

Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* CL Brener, clona obtenida de la cepa CL de *T. cruzi* aislada de *Triatoma infestans* en Rio Grande, Brasil [Brener y Chiari, 1963]. Se utilizaron 0.5 mL de inoculo de cultivos en fase logarítmica de epimastigotes *wild type* por cada 5 mL de medio LIT (*Liver Infusion-tryptose*; NaCl 60mM, KCl 5.36 mM, Na₂HPO₄ 29 mM, C₆H₂O₆ 11 mM, *liver infusión* 5 gr/L, triptosa 5 gr/L) complementado con 10% SFB (Suera fetal bovino), 0.5% de ampicilina-estreptomicina y Hemina 1/200 (partiendo de un stock de 5 mg/ml) en tubos falcón de 15 mL. Se incubaron a 28°C. Se resebraron los parásitos cada 7 días en las mismas condiciones. Se mantuvo el stock y los cultivos para experimentos posteriores.

6.2 Línea Celular.

Se utilizaron fibroblastos 3T3 NIH de embrión de ratón (ATCC Numero CLR-1658™). Se sembraron en cajas de cultivo *Corning* (100 X 20 mm de diámetro) a una razón de pase de 1:10 con 10 mL de medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO*) alta glucosa suplementado con 10% SFB y 0.5% de solución penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL en solución salina de NaCl al 0.85%) y se incubaron a 37°C en presencia de CO₂ al 5% hasta una confluencia del 80%. Para su resiembra, monocapas al 80% fueron lavadas con 5 mL de PBS 1X EDTA 0.53 M y se adicionaron 1 mL de tripsina-EDTA a 37°C durante 5 minutos. Se agitó ligeramente la caja para desprender las células, se tomaron 100 µL de la suspensión celular y se colocaron en la caja con el medio nuevo para mantener el stock. Los cultivos para uso experimental se sembraron en frascos de 25 cm² *Corning* y se incubaron a 37°C hasta obtener la confluencia deseada.

6.3 Extracción de ARN total.

El ARN total de epimastigotes fue extraído por medio del método de Trizol (Trizol® Reagent) siguiendo las indicaciones del fabricante. La pastilla de parásitos en micro tubos se re-suspendió con 3 volúmenes de trizol homogeneizando cuidadosamente hasta su disolución. Posteriormente se agregó un quinto de volumen de cloroformo, se mezcló bien en el vortex durante 15 segundos, se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron los tubos a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C obteniéndose tres fases, de abajo hacia arriba: una fase orgánica, una fase intermedia y la fase acuosa. Esta última se recuperó en un micro tubo limpio y se agregó medio volumen de isopropanol, se mezcló y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar el tubo a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 75% centrifugando a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C en cada ocasión. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar parcialmente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la pastilla fue resuspendida en agua libre de ADNAsas y ARNAsas.

La integridad del ARN total fue determinada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5x. Para la electroforesis 400 ng de ARN total se mezclaron con formamida v/v (Sigma No. Cat. F9037-100ML) para desnaturalizar la muestra. Esta mezcla se calentó a 65°C durante 10 minutos e inmediatamente después se colocará en hielo por 5 minutos. Posteriormente los ARN totales fueron separados electroforéticamente a 60 Volts durante una hora y media en agitación constante del buffer de corrida utilizando un agitador magnético y una mosca. El gel de agarosa se prepara con tiocianato de guanidina para concederle propiedades desnaturalizantes, su concentración es del 1.5% y los ARN fueron visualizados en el transiluminador MacroVue UVis-20 Hoefer®.

6.4 Obtención de ADN complementario (ADNc).

Se utilizó el ARN de epimastigotes como cadena molde para obtener el ADNc mediante el ensayo de *RT-PCR* utilizando el kit de *Superscript III FirstStrand* de Invitrogen (Cat. 18080-051). Se utilizó al oligo dT como oligo iniciador (Tabla 1). Una vez obtenido el ADNc se realizó la digestión del ARN con RNAasa H, posteriormente se llevó a cabo la extensión mediante *PCR* utilizando el oligo DRE-ME (Tabla 1), se desnaturalizó y se agregaron los oligonucleótidos DRE-dT y DRE-ME para la amplificación del ADN de doble cadena.

6.5 Reacción de *PCR*.

Se utilizaron 0.5 μ L de ADNc de epimastigote como templado para la reacción, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L que contenían 2 μ L $MgSO_4$, 8 μ L dNTPs 1.25 mM, 5 μ L de buffer Taq, 0.5 μ L de Taq recombinante (Invitrogen Cat. 11615-010) y 0.5 μ L de los oligonucleótidos sentidos y antisentidos descritos en la Tabla 1. Las reacciones se iniciaron con 5 minutos de desnaturalización a 94°C, posteriormente 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 60°C y 90 segundos a 72°C para la extensión y por último una tiempo de extensión final de 72°C durante 5 minutos.

6.6 *PCR* tiempo real.

Los oligonucleótidos que se utilizaron en la reacción de *qRT-PCR* se muestran en la Tabla 1. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 10 μ L usando 4 μ L de ADNc (diluido 1:100), 5 μ L de *SYBRGreen I master mix* (Qiagen) y 1 μ M de cada primer específico (Tabla 1) y serán realizadas en el termociclador

Rotor-Gene-Q (Qiagen, USA). Las condiciones de ciclos de temperatura fueron: 94°C por 10 minutos; 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos con una única medición de fluorescencia; se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos. De manera adicional, se analizaron la presencia de amplificadores adicionales mediante la curva *MELT* y de que el amplificado fuera una única banda mediante un corrimiento de los productos de reacción en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV.

6.7 Preparación de células competentes *E. coli DH5α*.

Una colonia de *E. coli DH5α* fue sembrada en 20 mL de medio LB (Luria-Bertani) incubándose toda la noche a 37°C en agitación constante. Posteriormente a 10 mL de medio *TYM* (Bacto-triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.1 M, MgSO₄ 10 mM) se adicionaron 300 µL del cultivo y se dejaron crecer hasta una densidad de 0.2-0.8 a 600 nm, incubándolas a 37°C en agitación constante. A continuación se adicionaron 50 µL de medio *TYM* y se dejaron crecer a 37°C en agitación constante hasta una densidad de 0.5-0.9 a 600 nm. Luego se adicionó medio *TYM* hasta completar un volumen final de 250 mL, se incubó a 37°C en agitación constante hasta obtener una densidad de 0.6 a 600 nm. Una vez obtenida la densidad deseada la muestra se centrifugó a 2500 rpm durante 8 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió suavemente en 50 mL de *TBF I* (KOAc 30 mM, MnCl₂ 50 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, Glicerol 15%) para evitar la lisis celular y manteniendo las células a 4°C, y se centrifugaron a 2500 rpm a 4°C durante 8 minutos. Finalmente la pastilla fue resuspendida en 5 mL de *TBF II* (MOPS 10 mM pH 7, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM, Glicerol 15%) manteniendo las mismas condiciones que en el paso anterior. Las células competentes se alicuotaron en tubos eppendorf (150 µL) y almacenaron a -70°C para su uso en ensayos posteriores.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las secuencias de interés. Subrayados se encuentran los sitios de corte de las enzimas de restricción.

Oligo	Secuencia	Producto esperado	Número de acceso de la secuencia blanco
Oligo dT	5'- GCGGCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'	Síntesis de ADNc.	Cola de poli a de los RNAm.
Oligo ME	5'- GCGGCGGATCCACAGTTTCTGTACTATATTG -3'		KF964669.1 (435-454)
AsTc53-S	5'- CCG <u>CTCGAG</u> ATGGTTCTGCTGACGGTAAAGGGC -3'	69 pbs. Oligonucleótidos para amplificar la secuencia antisentido.	TCCLB.506337.130 (184-207)
AsTc53-AS	5'- CCCA <u>AGCTTC</u> GTTGAGGCCGTGCATTCAAAG -3'		TCCLB.506337.130 (252-230)
AsTc80-S	5'- CCG <u>CTCGAG</u> ATGCAGCAGCCCGCGTCACTGAGC -3'	66 pbs. Oligonucleótidos para amplificar la secuencia antisentido.	TCCLB.503395.20 (151-174)
AsTc80-AS	5'-CCCA <u>AGCTTC</u> GGTACCGCACGTTTAATCACAGG -3'		TCCLB.503395.20 (193-216)
pTREXnHX1-S	5'- TCCA <u>ACTTCTTT</u> TATGATGT -3'	Para observar la expresión del transcrito antisentido, 150 pbs aproximadamente.	Esqueleto del vector pTREXn, región HX1 (150-170)
Tripanina-S	5'- GGATCCATGCCACCAAAGGAAAGGGCAGTTG -3'	1832 pbs. <i>Housekeeping</i> para evaluar la síntesis del ADNc.	XM_803193.1 (1-25)
Tripanina-AS	5'- CTCGAGCTACCCACTTACCCAGAAATGCC -3'		XM_803193.1 (1363-1386)
L13Ribo-RT S	5'- TCCTTGCATGCTGATGTGGT -3'	<i>Housekeeping</i> para <i>qPCR</i>	XM_807652.1 (375-394)
L13Ribo-RT AS	5'- ATACAGCCACGCCTTTTCCA -3'		XM_807652.1 (458-477)
TcGAPDH-S	5'- GGATGGAGGATGTTGTCTTGCCGG -3'		XM_800974.1 (71-94)
TcGAPDH-AS	5'- GCTCACTAAAGGGTCCGTG -3'		XM_800974.1 (153-171)
qPCRTc53-S	5'- CGACTTTACGCGCTACACGACAAC -3'	<i>qPCR</i> del gen Tc53	TCCLB.506337.130 (574-597)
qPCRTc53-AS	5'- CTGCTGCTTCCACCGCTTGTC -3'		XM_809929.1 (652-672)
qPCRTc80-S	5'- GCACCTCCCGCTCCTGTGATTAAC -3'	<i>qPCR</i> del gen Tc80	TCCLB.503395.20 (181-205)
qPCRTc80-AS	5'- GCAAAGTCGTCGAGCACCGAAAAC -3'		TCCLB.503395.20 (255-278)

6.8 Extracción de ADN plasmídico.

6.8.1 Método de Lisis Alcalina.

Una colonia bacteriana conteniendo el plásmido de interés se agregó a 20 mL de medio LB complementado con 20 µL de ampicilina. Se dejó crecer durante toda la noche a 37°C en agitación constante. El cultivo fue centrifugado a 8500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 200 µL de solución para lisis alcalina 1 (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) mezclándose por inversión. Los pasos siguientes fueron realizados a 4°C. Se adicionaron 400 µL de solución para lisis alcalina 2 (NaOH 0.2 N, SDS 1% preparado en fresco). Se mezcló 5 veces por inversión y se adicionó inmediatamente después 300 µL de solución para lisis alcalina 3 (5 M CH₃CO₂K 60 mL, 11.5 mL de ácido acético glacial, 28.5 mL de H₂O). Se mezcló 5 veces por inversión y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 2 µL de ARNasa A (Sigma Cat. No.R4875) y se incubó 2 horas a 37°C. Para la extracción del ADN de plásmido se adicionó 1 volumen de fenol-cloroformo isoamílico 25:24:1, se mezcló vigorosamente y se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 600 µL de isopropanol y se incubó la muestra 10 minutos en hielo. A continuación se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 500 µL de etanol al 70% para lavar la pastilla (2 veces) mezclando vigorosamente en vórtex y centrifugando a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla fue resuspendida en 10x Tris EDTA (TE: Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8).

6.8.2 Extracción de ADN de plásmido por el método de Cloruro de cesio.

Para la obtención de ADN de plásmido por la técnica de cloruro de cesio se colocó un cultivo de 20 mL de medio LB el cual contenía 20 μ L de ampicilina 100 mg/mL con una colonia de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con cada una de las construcciones en estudio. Los cultivos fueron incubados todo el día a 37°C a 250 rpm. Cinco mL de este cultivo se sembraron en 500 mL de medio LB complementado con 500 μ L de Ampicilina 100 mg/mL incubándose 37°C durante toda la noche a 250 rpm. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 4 mL de solución TS (Tris-HCl 50mM pH 7.5, sacarosa 25%) a continuación se agregaron 4 mL de solución ELT (EDTA 50mM, Lisozima 12 mg/mL, tritón 5%) se mezclaron por inversión y se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron colocadas en baño María a 70°C durante 15 minutos, luego la muestra fue transferida a tubos Beckman y después de calibrar los tubos con TE se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckman a 40,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le adicionó 1 volumen de solución PEG/NaCl (PEG 6000 20%, NaCl 1 M, Tris-HCl 1 M pH 8, EDTA 0.5 M) se mezclaron y dejaron incubando durante una hora en hielo.

Posteriormente se centrifugaron a 8500 rpm durante 20 minutos a 4°C (Centrífuga Heraeus Multifuge 3 S-R). Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 3 mL de solución TE y se adicionaron 10 μ L de ARNasa A y se incubaron durante dos hora a 37°C. Posteriormente se agregaron 4 gramos de CsCl mezclando a totalidad y se agregaron 400 μ L de bromuro de etidio sobre la mezcla (sin mezclar) y cada uno de los tubos fue calibrado. Después de sellar los tubos, estos fueron agitados para mezclar y posteriormente se centrifugaron en la ultracentrífuga a 90,000 rpm durante cuatro horas a 16°C, lo que permitió la formación de las bandas de ADN de plásmido. Con cuidado de no mezclar las bandas, estas fueron extraídas del tubo mediante punción con una jeringa de 5 mL

y el producto obtenido fue lavado por centrifugación de tres a cuatro veces con butanol saturado hasta retirar todo el bromuro de etidio. A continuación se procedió a la extracción del ADN con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 24:25:1 agregando 1 volumen, mezclando y centrifugando a 12000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se formaron dos fases: una fase orgánica en la parte inferior de la mezcla y una fase acuosa en la parte superior, esta última se recolectó en un nuevo tubo. Se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN, el cual fue recuperado por centrifugación a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se lavó (2 veces) con un volumen de etanol 70% centrifugando a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca la pastilla se resuspendió en 200 µL de TE. La integridad de los productos fue evaluado en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5 X y por cuantificación en Nanodrop ND1000.

6.9 Generación de los parásitos transfectantes estables.

Para la generación de los parásitos transfectantes estables, epimastigotes CL Brener fueron transfectados por electroporación con 100 µg de ADN de cada una de las construcciones (pTREXn-AsTc53, pTREXn-AsTc80 y los controles: pTREXn y pTREXn-GFP). Para esto se utilizaron 3×10^8 epimastigotes cepa CL Brener los cuales fueron lavados con 5 mL de medio LIT sin complementar. Posteriormente se colocaron en celdas BTX previamente enfriadas en hielo y se adicionaron 40 µL del ADN (100 µg de ADN previamente precipitado con 1/10 de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto), se dejaron incubando durante 5 minutos en hielo y en seguida se electroporaron a 300 V/1 pulso durante 12 ms. Posteriormente se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se pasaron a 5 mL de medio LIT complementado, 0.5% de penicilina-estreptomicina 5 mg/mL y 1/200 de hemina 5 mg/mL en tubos falcón de 15 mL, se dejaron incubando a 28°C. Para llevar a cabo la selección de los parásitos

transfectados a las 48 hrs después de la transfección se les agregaron 500 µg/mL de geneticina (G418) y se dejaron seleccionar con la droga durante 15 días incubados a 28°C. La eficiencia de selección fue monitoreada por la evaluación de la fluorescencia de los parásitos transfectados con el ADN de pTREXn-GFP, ya que estos parásitos expresaron a la proteína verde fluorescente. Una vez que los parásitos control se encontraban a un 95% de fluorescencia se les quitó la droga durante 3 días y posteriormente se realizó una segunda selección con 500 µg/mL de G418 incubando a los parásitos durante 5 días. A continuación se llevó a cabo la expansión de los parásitos transfectantes estables en 50 mL de medio LIT complementado para llevar a cabo los experimentos posteriores.

Los parásitos transfectantes estables fueron nombrados de acuerdo al vector que contenían: parásitos pTREXn para los transfectados con el esqueleto del vector pTREXn, parásitos AsTc53 para los transfectados con la secuencia antisentido para *Tc53*, parásitos AsTc80 para los transfectados con la secuencia antisentido para *Tc80*, parásitos GFP para los transfectados con la proteína verde fluorescente (GFP) y CL Brener sin transfectar para los parásitos no transfectados.

6.10 Infecciones primarias de fibroblastos 3T3 NIH con parásitos transfectantes estables.

Para evaluar la capacidad de infección de los parásitos transfectantes estables (pTREXn, AsTc53 y AsTc80). Monocapas de fibroblastos 3T3 NIH fueron crecidas hasta un 60% de confluencia en cajas *Corning* de 25 cm² en medio DMEM alto en glucosa complementado con 10% SFB y 0.5% de solución penicilina-estreptomicina (10,000 U/ml en solución salina de NaCl al 0.85%). Se incubaron a 37°C en atmosfera del 5% de CO₂. Para llevar a cabo la infección, se utilizó un inóculo de 1x10⁷ parásitos totales. Para ello, a las parásitos crecidos en medio LIT en presencia de G418, fueron contados en una cámara de Neubauer. Los parásitos fueron recuperados del medio de cultivo centrifugándolos a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 5 mL de medio DMEM sin complementar centrifugando a 3000 rpm durante 10

minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la pastilla fue resuspendida en 2 mL de medio DMEM al 2% de SFB y se agregó al sobrenadante de las células a las cuales previamente se les cambió el medio DMEM al 10% de SFB por medio DMEM al 2% de SFB. Las infecciones fueron incubadas a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% durante 48 horas. Una vez transcurridas las 48 horas, las monocapas fueron lavadas diariamente cambiando el medio de cultivo y manteniéndolas con DMEM al 2% de SFB. El conteo del número de células infectadas y el número de parásitos liberados al sobrenadante se inició al quinto día post-infección.

6.11 Ensayo de invasión y evaluación de la eficiencia de transformación de los parásitos transfectantes estables.

Monocapas de fibroblastos 3T3 NIH sembradas hasta un 60% de confluencia dentro de cajas de 25 cm² en medio DMEM alto en glucosa complementado con 10% SFB y 0.5% de solución penicilina-estreptomocina (10,000 U/mL en solución salina de NaCl al 0.85%) fueron incubadas a 37°C en atmosfera del 5% de CO₂ y fueron infectadas con 1X10⁷ epimastigotes AsTc53 y AsTc80. Como controles se utilizaron epimastigotes pTREXn (*MOCK*) y epimastigotes GFP. Para ello, las monocapas al 60% de confluencia fueron cambiadas a medio DMEM alto en glucosa suplementado con el 2% de SFB y 0.5% de solución penicilina-estreptomocina (10,000 U/mL en solución salina de NaCl al 0.85%). Los parásitos crecidos en medio *LIT* (como se describe anteriormente) fueron contados en la cámara de Neubauer (1X10⁷ parásitos totales) y centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para quitar el medio de cultivo. Posteriormente, fueron lavados con 5 mL de medio DMEM sin complementar centrifugándolos a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 2 mL de medio DMEM complementado con el 2% de SFB y 0.5% de solución penicilina-estreptomocina (10,000 U/ml en solución salina de NaCl al 0.85%) y fueron agregados al sobrenadante de las monocapas al 60% de confluencia. Las infecciones se incubaron durante 48 horas a 37°C en atmosfera

del 5% de CO₂. Transcurridas las 48 horas se contó el porcentaje de transformación de los parásitos en el sobrenadante contando el número de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes presentes en el sobrenadante.

6.12 Análisis *in silico* de las proteínas codificadas por los genes Tc53 y Tc80.

Para el análisis de las proteínas codificadas por los genes en estudio, se tomaron las secuencias proteicas reportadas en el *NCBI* y se les llevo a cabo un análisis de tipo PHI-BLAST para búsqueda de similitud proteica. Primero se realizó el análisis contra toda la base de datos del *NCBI* y en posteriormente contra las proteínas de referencia de *Saccharomyces*. Conforme se llevaba a cabo el alineamiento, se iba tomando nota de los dominios encontrados por el programa BLAST para posteriormente realizar la búsqueda de información de los dominios encontrados.

También, se llevó a cabo la búsqueda de los genes ortólogos en la base de datos de TritypDB, buscando la información ya reportada sobre estos genes y si se asociaban a diferenciación en tripanosomátidos.

Además, se llevó a cabo la búsqueda de secuencias de localización celular utilizando los programas PSORTII, iPSORT, MitoProt II, TargetP 1.1, cNLSmapper y Yloc.

6.13 Ensayo de metaciclologénesis.

Se sembraron epimastigotes en razón de 1:10 en 5 mL de medio *LIT* complementado y se incubaron a 28°C durante 12 días. Posteriormente el cultivo se lavó con PBS 1x y se resuspendió en 2 mL de medio *TAU* (NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM y buffer de fosfatos 8 mM (fosfato de potasio

monobásico 0.205 M y fosfato de sodio dibásico 0.112 M)) y se incubaron 2 horas a 28°C.

Posterior a las 2 horas, se contaron los parásitos y se suspendieron 5×10^6 epimastigotes en un volumen final de 1 mL en medio *TAU3AAG* (Medio TAU adicionado con 0.35% de carbonato de sodio, L-prolina 10 mM, L-glutámico 50 mM, L-aspártico 2 mM, Glucosa 10 mM y penicilina 500 U) en cajas de 10 cm² y se dejaron incubando a 28°C.

Durante 5 días se llevó a cabo la cuenta de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos en las cajas de forma diaria, haciendo la relación del número de tripomastigotes metacíclicos en el total de parásitos.

7. RESULTADOS.

7.1 Análisis bioinformático de las secuencias de *Tc53* y *Tc80*.

Como se mencionó anteriormente, el análisis *in silico* inicial de *Tc53* y *Tc80* en los bancos de datos del parásito, indicó que ambas secuencias corresponden a proteínas hipotéticas que no cuentan con homología con proteínas ya reportadas. Este análisis fue realizado usando la herramienta BLAST de la base de datos del *NCBI*, buscando genes que guardaran una homología alta con las secuencias en estudio.

Por lo tanto, a fin de tener un acercamiento de la posible función de los genes en estudio, decidimos llevar a cabo un análisis bioinformático más profundo y con criterios de astringencia menos estrictos, con el fin de ampliar nuestra búsqueda. Para este análisis, se tomaron las secuencias proteicas de los genes en estudio y se realizaron alineamientos con la herramienta PHI-BLAST de la base de datos del *NCBI* de dos formas: La primera, un alineamiento general para encontrar proteínas con similitud a las proteínas hipotéticas y poder indagar un poco en cuanto a la posible función de las proteínas en estudio; y la segunda, el mismo alineamiento pero contra proteínas de referencia de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que sus proteínas pueden estar relacionadas en mayor forma con las de *T. cruzi* en cuanto a similitud con respecto a las otras secuencias. En ambos casos, los resultados mostraron bajos niveles de identidad con respecto a la secuencia total y un porcentaje de similitud mayor sólo en algunas regiones de la secuencia (Tablas 2, 3 y 4).

Además de lo anterior, se llevó a cabo un análisis de las secuencias ortólogas presentes en las bases de datos de TritypDB de tripanosomátidos. Esto para evaluar si existen reportes de proteínas ortólogas de *Tc53* y *Tc80* en otros tripanosomátidos y si en caso de haberlas, saber si se ha mostrado su asociación con el proceso de diferenciación de dichos parásitos.

En la primera parte del análisis (Tabla 2), el programa BLAST encontró similitud entre *Tc53* y un fragmento de la proteína XP_001699200.1 del cuerpo flagelar basal de *Chlamydomonas* (41% de similitud) y de la proteína CDS20413.1 de *Echinococcus* (64% de similitud). En el caso de la primer proteína, se ha sugerido

que es una proteína asociada al flagelo de *Chlamydomonas* y que su función parece ser regulada de alguna forma por calcio. La proteína de *Echinococcus* es una proteína de unión a calcio. También de esta forma, se encontró similitud entre Tc80 y la superóxido dismutasa SOD2 de *Toxoplasma gondii* (43% de similitud). Cabe mencionar que para este análisis sólo se analizó la sección de la secuencia de la proteína identificada por la base de datos, que alineaba con la proteína codificada por el gen en estudio (Tabla 4, marcado en verde).

Tabla 2. Homología de las proteínas codificadas por los genes *Tc53* y *Tc80* con proteínas en la base de datos del *NCBI*, usando un análisis BLAST de astringencia baja.

Gen	Proteínas con homología	Porcentaje de identidad	Porcentaje de similitud
<i>Tc53</i>	XP_001699200.1 del cuerpo flagelar basal de <i>Chlamydomonas</i> .	26	41
	CDS20413.1, sitio de unión a calcio de una proteína en <i>Echinococcus</i> .	42	64
<i>Tc80</i>	EPR58845.1 de la superóxidodismutasa SOD2 de <i>Toxoplasma</i> .	29	43

En la segunda parte del análisis (Tabla 3), el programa BLAST encontró similitud entre *Tc53* y un grupo de fosfatasa de *Saccharomyces*, así como con proteínas con propiedades de unión a calcio, entre otros. En esta parte del análisis, el programa BLAST arrojó que *Tc80* guarda similitud con la proteína Rrg1p de *Saccharomyces* (47% de similitud), la cual se ha observado mantiene la estabilidad del material genético mitocondrial de la levadura [Merz y Westermann, 2009]. Los dos análisis anteriores se hicieron en cuanto al porcentaje de similitud, pero tomando en cuenta también solamente el fragmento de la proteína en estudio, que alinea con la proteína identificada por el análisis bioinformático (Tabla 4, marcado en verde).

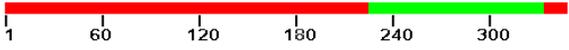
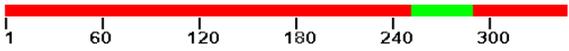
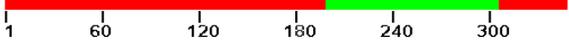
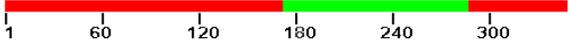
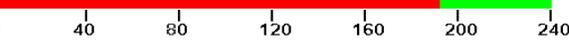
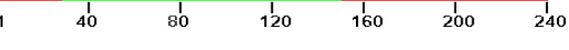
En la tercera parte del análisis se buscó información sobre los genes ortólogos de *Tc53* y *Tc80* en la base de datos de TritypDB. No se encontró información relevante en las proteínas ortólogas de *Tc53*. En el caso de *Tc80*, se encontró que el ortólogo Tb927.11.4330 en *T. brucei* aumenta su expresión durante la diferenciación del parásito de forma delgada sanguínea a forma procíclica. Estos ensayos se realizaron mediante microarreglos y *RT-qPCR* [Kabani y col., 2009]. El aumento de su expresión durante la diferenciación del parásito posiblemente sea sugerente de que pudiera tener un papel en la diferenciación de *T. brucei*; sin embargo, no hay reportes de estudios en donde se haya evaluado esta posibilidad.

Tabla 3. Homología de las proteínas codificadas por los genes *Tc53* y *Tc80* con proteínas de referencia en *Saccharomyces cerevisiae*, en la base de datos del *NCBI* usando un análisis BLAST de astringencia baja.

Gen	Homología con proteínas de <i>Saccharomyces</i>	Porcentaje de identidad	Porcentaje de similitud
<i>Tc53</i>	Fosfatasa Rtg2p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	24	42
	Tirosinfosfatasa Yvh1p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	32	56
	Protein cinasa HSL1 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	22	40
	Calnexina [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	27	45
	Pwp1p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	26	38
<i>Tc80</i>	Proteína mitocondrial Rrg1p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	31	47

En el caso de *Tc53*, encontramos que la sección de la proteína que conserva similitud con Rtg2p (42% similitud), Yvh1p (56% de similitud) y HSL (40% de similitud), corresponde al sitio activo de las enzimas, lo cual nos sugiere la posibilidad de una función en cuanto a metabolismo de grupos fosfato.

Tabla 4. Esquema representativo de la alineación de Tc53 y Tc80 con las proteínas encontradas por el análisis *in silico*.

Proteína	Homología con proteínas de las bases de datos	Esquema representativo de la proteína en estudio.
Tc53	Fosfatasa Rtg2p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	
	Tirosinofosfatasa Yvh1p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	
	Proteincinasa HSL1 [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	
	Calnexina [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	
	Pwp1p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	
	XP_001699200.1 cuerpo flagelar basal de <i>Chlamydomonas</i>	
	CDS20413.1 sitio de unión a calcio de una proteína <i>Echinococcus</i> .	
Tc80	Proteína mitocondrial Rrg1p [<i>S. cerevisiae</i> S288c]	
	EPR58845.1 de la superóxido dismutasa SOD2 de <i>Toxoplasma</i> .	
En el esquema se muestran en verde las partes de las proteínas que tienen similitud con las proteínas codificadas por los genes Tc53 y Tc80.		

Además de lo anterior, se llevó a cabo la búsqueda de dominios en las proteínas (Tabla 5), encontrándose únicamente el dominio DUF2870 en la secuencia aminoacídica de Tc53. Este dominio se encuentra conservado en la calnexina, la proteína de unión a calcio de *Echinococcus* y la proteína del cuerpo

flagelar basal de *Chlamydomonas*, con las que guarda homología en esa sección de la proteína (Tabla 4). Este resultado podría indicar una importante función que podría ser compartida por estas proteínas, lo que requeriría de estudios posteriores que lo demuestren.

Por último, a fin de obtener mayor información que ayude en la dilucidación de la posible función de las moléculas en estudio, se llevó a cabo la predicción de localización celular de las proteínas Tc53 y Tc80 (Tabla 5). Como resultado de este análisis se encontró que Tc53 tiene una localización putativa en citoplasma (identificada con el programa Mitoprot II), mientras que Tc80 tiene una localización putativa en mitocondria y/o nuclear monopartita (identificada con el programa cNLSmapper).

Tabla 5. Análisis *in silico* de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes *Tc53* y *Tc80*.

Proteína	Localización celular	Dominios
Tc53	Citoplasma	DUF2870
Tc80	Nuclear / Mitocondrial	Sin detección de dominios

De forma general, el análisis bioinformático arrojó resultados variados para Tc53, aunque apuntan hacia una función de tipo fosfatasa o de proteína con unión a calcio. En el caso de Tc80, el análisis arrojó una localización mitocondrial y probable función en regulación de radicales de oxígeno. Sin embargo, será necesario avanzar en el trabajo experimental para saber si pudieran compartir alguna de estas funciones y dilucidar su posible participación en el proceso de diferenciación de *T. cruzi*.

7.2 Obtención de parásitos transfectantes estables con pTREXn, pTREXn-AsTc53, pTREXn-AsTc80 y pTREXn-GFP.

Para evaluar la participación de las secuencias obtenidas en la biblioteca de sustracción en el proceso de diferenciación del parásito, es posible realizar los análisis desde dos enfoques distintos. Por un lado se puede realizar la caracterización biológica y molecular de la molécula en estudio, seleccionar aquellas que de acuerdo a los resultados sugieran que podrían tener una posible función en diferenciación y después evaluar su función utilizando estrategias genéticas. Por el otro, se podría primero hacer un análisis funcional y posteriormente realizar la caracterización biológica y molecular de sólo aquellas moléculas que muestren tener una participación en el proceso de diferenciación.

Debido a que las secuencias en estudio están catalogadas como hipotéticas, su caracterización es importante aun cuando su función resultara no estar relacionada con diferenciación. Sin embargo, ya que nuestro interés principal es identificar aquellas que estén participando en el proceso de diferenciación del parásito, optamos por seguir el segundo enfoque.

Para ello es posible utilizar distintas estrategias genéticas. En este trabajo, la obtención de parásitos *Knockout* (KO) no fue considerada, ya que Tc80 es codificada por genes de copia múltiple. No fue posible tampoco utilizar el sistema del ARN interferente (ARNi), debido a que *T. cruzi* carece del complejo DICER [Ullu y col. 2004]. La posibilidad de obtener y caracterizar mutantes dominantes negativas también se eliminó debido a que no sabemos si Tc53 y/o Tc80 interaccionan con otras proteínas para ejercer su función, lo que es un requisito indispensable en el uso de este abordaje experimental.

Por lo tanto, sólo dos abordajes experimentales fueron considerados para su uso en este trabajo de investigación. El primero, que consiste en la obtención y caracterización de parásitos transfectados estables, que expresen un fragmento de la secuencia de forma exógena en antisentido al transcrito en estudio (parásitos *Knockdown* o *KD*), con una esperada disminución consecuente del nivel de la proteína correspondiente y por lo tanto de su función. El segundo, que consiste en

la obtención y caracterización de parásitos transfectantes estables que expresen una copia ectópica de la secuencia en estudio, que junto con la expresión de la secuencia endógena muestren la sobreexpresión total de la proteína en estudio y por lo tanto se esperaría la exacerbación (positiva o negativa) de la función en que está involucrada.

En este trabajo seleccionamos como primera instancia la estrategia de parásitos *KD*. Este enfoque es una herramienta molecular para el análisis genético reverso en protozoos parásitos [Militello y col., 2008], que se ha utilizado con éxito en *T. cruzi* por otros grupos de investigación [Allaoui y col., 1999] y nuestro grupo [Noris-Sarabia, tesis de doctorado y Rubio-Ortiz, tesis de doctorado]. Se ha reportado que esta estrategia permite de manera específica la reducción simultánea de los niveles de ARNm y de la proteína correspondiente. Además, se ha reportado que es posible reducir los niveles de proteína sin reducir los niveles de su ARNm, al inhibir la traducción del transcrito cuando la secuencia antisentido está dirigida a su extremo 5'. Esta estrategia además, tiene la ventaja de permitir la evaluación funcional de locus esenciales, ya que no hay un abatimiento total del ARNm en estudio que comprometa la viabilidad de los parásitos transfectados, y es también útil en el análisis de blancos de copias múltiple [Militello y col. 2008].

Para generar los parásitos transfectantes estables que expresaran los ARN antisentido, cada una de las construcciones hechas en el vector de expresión pTREXn fue electroporada en epimastigotes CL Brener. Las construcciones utilizadas fueron: pTREXn (esqueleto del vector) como control experimental (*MOCK*); pTREXn-AsTc53, el vector conteniendo la secuencia antisentido del gen *Tc53*; pTREXn-AsTc80, el vector conteniendo la secuencia antisentido del gen *Tc80*; y pTREXn-GFP, control de la transfección y de secuencia no relacionada que contiene la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente. La forma de parásitos usados para la transfección fueron epimastigotes, ya que es el único estadio de *T. cruzi* que puede ser cultivado en el laboratorio, permitiendo tanto la selección de los parásitos, como la elaboración de los experimentos posteriores. Cabe mencionar que las construcciones ya habían sido obtenidas en trabajos previos a este proyecto y se eligió utilizar como vector pTREXn, ya que es un vector

con un promotor fuerte ribosomal, el cual recombina en las secuencias intergénicas de los genes ribosomales del parásito y permite una expresión constitutiva de las proteínas o secuencias en estudio [Lorenzi y col., 2002].

Después de dos rondas de selección con 500 µg/mL de G418 se obtuvieron parásitos estables resistentes a la droga para todas las construcciones (pTREXn, pTREXn-AsTc53, pTREXn-AsTc80 y pTREXn-GFP). En el caso de los parásitos transfectados con pTREXn-GFP se observó que el 100% de los epimastigotes expresaban la proteína verde fluorescente.

Este resultado indicó la exitosa obtención de parásitos transfectados establemente con las construcciones control (pTREXn y pTREXn-GFP) y en estudio (pTREXn-AsTc53, pTREXn-AsTc80).

7.3 Evaluación de la expresión de las secuencias antisentido de *Tc53* y *Tc80*.

Una vez obtenidos los parásitos estables, se procedió a comprobar la expresión del transcrito antisentido en los parásitos AsTc53 y AsTc80 por *RT-PCR* de punto final, utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 1. Los oligonucleótidos se diseñaron de forma que sólo se amplificara el ADNc correspondiente al transcrito antisentido. Para esto, los oligonucleótidos amplifican desde la secuencia antisentido hasta una secuencia presente en el esqueleto del vector (secuencia HX1), obteniéndose un amplificado de aproximadamente 150 pbs presente únicamente en la secuencia exógena y no en el control *MOCK*.

Como se observa en la Figura 12, se obtuvo un amplificado de 150 pbs con el ADNc de los parásitos AsTc53 y AsTc80. En el caso de la muestra de los parásitos pTREXn y GFP, no se obtuvo amplificado confirmando la especificidad del ensayo.

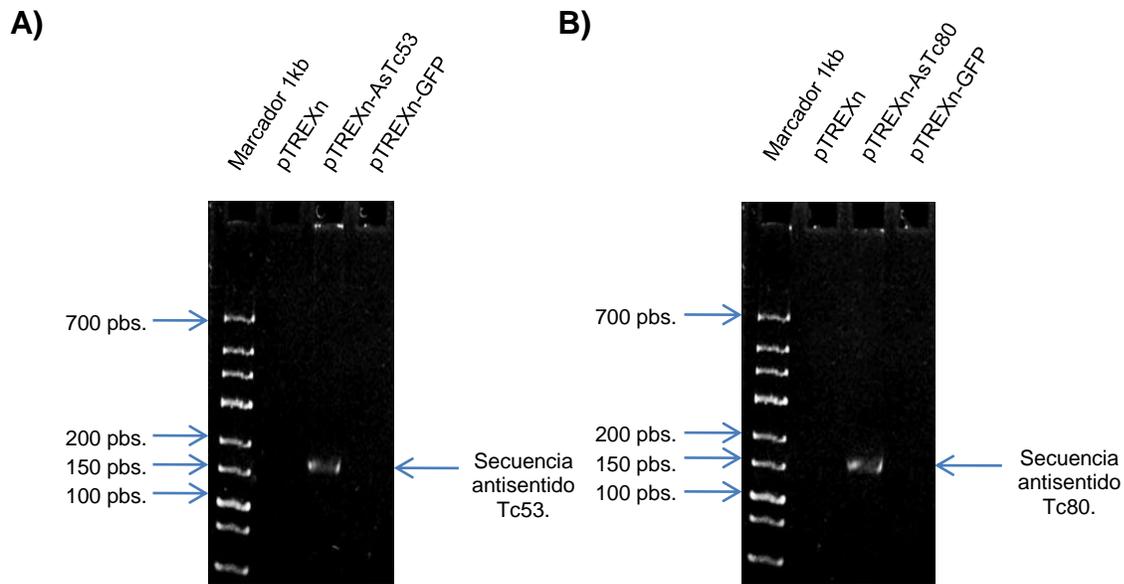


Figura 12. Transcripción de la secuencia antisentido en los parásitos AsTc53 y AsTc80. Geles de poliacrilamida mostrando la expresión de la secuencia antisentido para *Tc53* (A) y *Tc80* (B) en los parásitos transfectados con los vectores que contienen las secuencias antisentido.

Estos resultados indicaron que los parásitos AsTc53 y AsTc80 expresan el transcrito antisentido correspondiente.

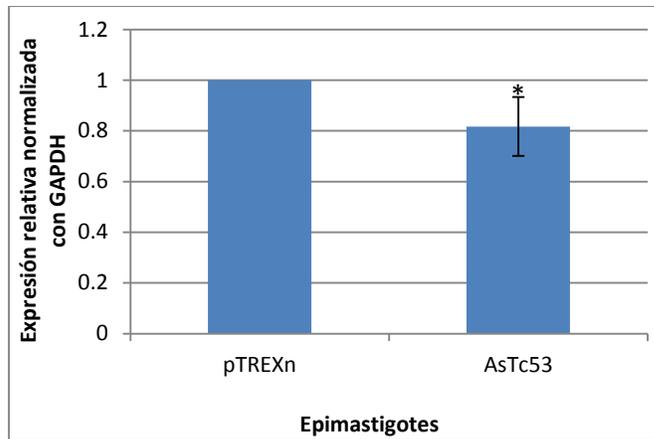
7.4 Evaluación de la obtención de fenotipo *Knockdown* en los parásitos transfectantes estables.

Posterior a la comprobación de la transcripción de las secuencias antisentido, se buscó comprobar la obtención de parásitos *Knockdown* (KD) para *Tc53* y *Tc80*. Para esto, se midió el cambio en los niveles del ARNm endógeno de estos genes, mediante *PCR* tiempo real y se utilizó el nivel de ARNm endógenos control de *GAPDH* y de la proteína ribosomal L13 para la normalización de los datos (Anexo 1). El gen *GAPDH* ha sido utilizado para estos fines en diversos trabajos de investigación y se ha comprobado que es un buen gen control para esta clase de

ensayos [Zingales y col., 2015]; sin embargo, cuando hicimos un análisis del transcriptoma del parásito (http://tritrypdb.org/tritrypdb/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source_id=TcCLB.503687.20&project_id=TriTrypDB) hecho entre sus diferentes estadios del desarrollo (epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes), observamos que *GAPDH* no mantiene sus niveles de ARNm a niveles tan similares (Figura 20 del anexo 1). De dicho análisis, decidimos entonces también utilizar como gen *housekeeping* a la proteína ribosomal L13, ya que fue la secuencia que mejor mantiene sus niveles de expresión entre los diferentes estadios de desarrollo (Figura 13 del anexo 1). Cabe mencionar que no encontramos ningún gen, que mantenga exactamente el mismo nivel de expresión entre las distintas formas del parásito.

Como resultado de este análisis, observamos una disminución del 18.3% en el transcrito de *Tc53* (Figura 13A) en los parásitos AsTc53, el cual fue estadísticamente significativo en comparación con el control MOCK. Este resultado comprobó que se obtuvieron parásitos *KD* de *Tc53*, pudiendo continuar con la evaluación del fenotipo de los parásitos *KD*. Será necesario determinar en experimentos futuros, el nivel de la proteína endógena por ensayos de *western blot*, la cual podría ser aún menor que el nivel del transcrito. Esto es debido, a que el antisentido fue dirigido al extremo 5' del ARNm, lo que resulta por lo regular en una inhibición de la traducción junto con la degradación del mensajero. Finalmente, también será necesario evaluar, en experimentos futuros, los niveles de ARNm endógeno y proteína en las diferentes formas de desarrollo del parásito y FI, en donde posiblemente el abatimiento del ARNm endógeno sea mayor.

(A)



(B)

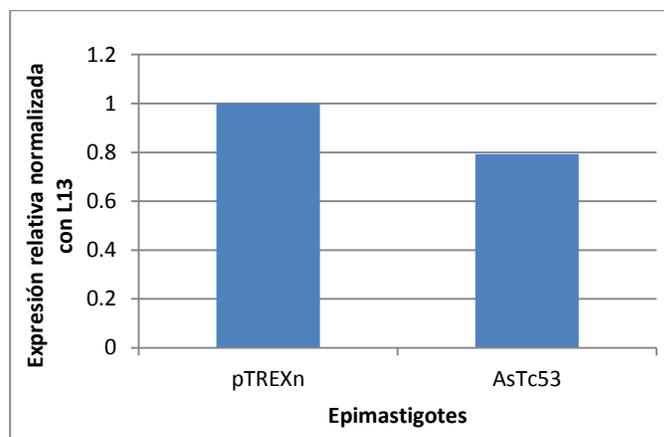


Figura 13. Cuantificación de los niveles de transcrito de *Tc53* por qPCR en los parásitos *MOCK* y *AsTc53*. (A) Niveles de transcrito de *Tc53* normalizando con *GAPDH* ($n = 1$ por duplicado) y (B) niveles de transcrito de *Tc53* normalizando con *L13* ($n = 1$). **: $P \leq 0.05$.

Contrario a lo esperado, observamos un incremento del 32% en los niveles de transcrito de *Tc80* (Figura 14B) en los parásitos *AsTc80*. Una posible explicación a este resultado, sería que al disminuir la expresión de *Tc80* por efecto del antisentido, se indujera un mecanismo de autorregulación, como ya se ha demostrado con otros genes en otros sistemas [Pelechano y Steinmetz, 2013]. Otra posibilidad es que exista la disminución de la proteína y no del mensajero. Y finalmente, otra posibilidad es que no se vea el efecto del *KD* en epimastigotes y si en tripomastigotes o FI. Por lo que se requerirán experimentos futuros para evaluar esta posibilidad.

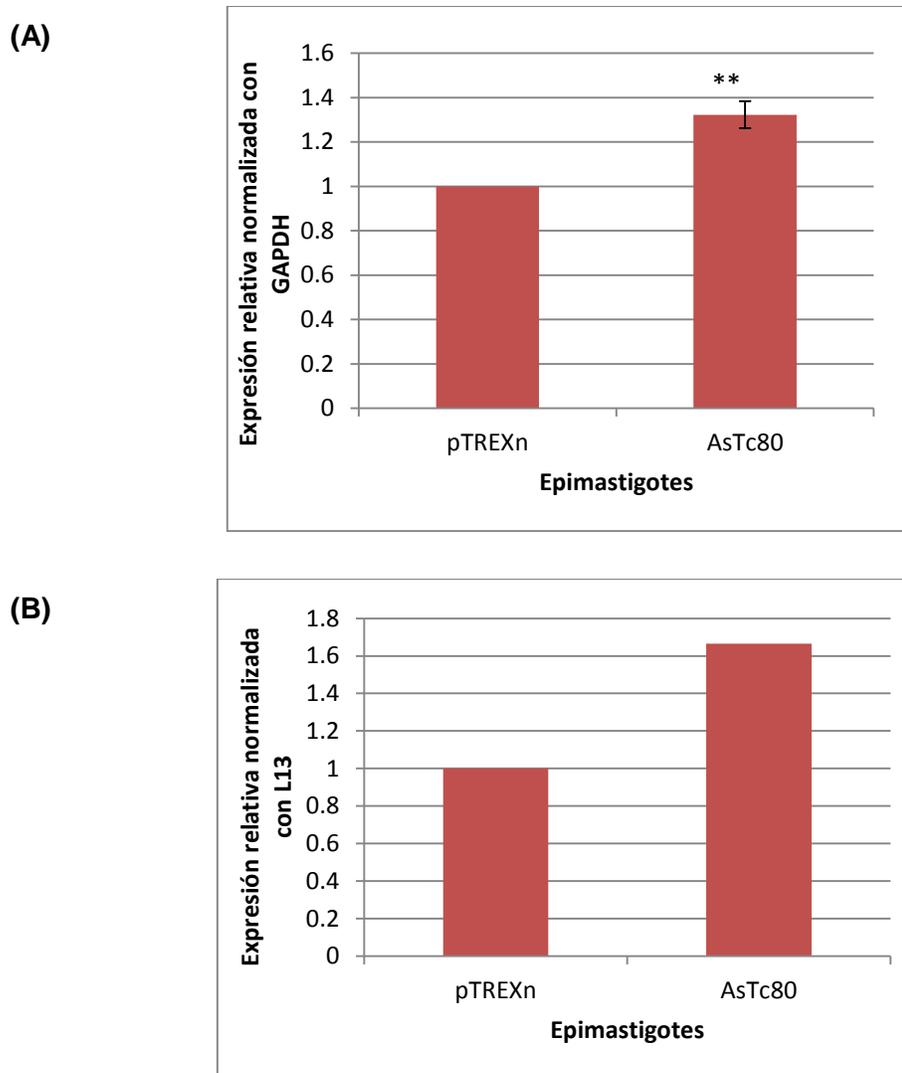


Figura 14. Cuantificación de los niveles de transcrito de *Tc80* por qPCR en los parásitos *MOCK* y *AsTc80*. (A) Niveles de transcrito de *Tc80* normalizando con *GAPDH* ($n = 1$ por duplicado) y (B) niveles de transcrito de *Tc80* normalizando con *L13*. ($n = 1$). **: $P \leq 0.01$.

Con respecto a la primera posibilidad, se sabe que en eucariontes el principal nivel de regulación de la expresión es a nivel transcripcional. Sin embargo, en eucariontes divergentes como son los tripanosomátidos, este sistema es inexistente y se ha demostrado que llevan a cabo la regulación de su expresión principalmente a nivel postranscripcional (por eficiencia de *trans-splicing* y poliadenilación), aunque también se ha visto regulación a nivel traduccional [Kramer, 2012]. Por lo tanto, en caso de existir un mecanismo de autorregulación en los parásitos *KD* de *Tc80*

esperaríamos que fuera a nivel postranscripcional, requiriéndose estudios futuros para demostrar esta posibilidad. Con respecto a la segunda posibilidad, hay que considerar que el aumento en los niveles del transcrito de *Tc80* no necesariamente indica un aumento en el nivel de la proteína. Como se explicó anteriormente el diseño experimental dirigiendo el antisentido al extremo 5' del transcrito endógeno podría disminuir la traducción de la proteína. Por lo que sería necesarios experimentos futuros de *western blot* para confirmar la obtención o no de los parásitos *KD* de *Tc80*. Finalmente, considerando la última posibilidad, del mismo modo que en el caso de AsTc53, es necesario evaluar los niveles de mensajero y proteína de *Tc80* en las demás formas de desarrollo del parásito. Por lo tanto, con los resultados que tenemos hasta el momento no podemos determinar si los parásitos transfectados AsTc80 son o no *KD*.

Cabe mencionar que usando el transcrito tanto de GAPDH como de L13, como controles de carga en los ensayos de RT-PCR tiempo real, se obtuvieron resultados similares en los parásitos transfectados estables con las secuencias antisentido de *Tc53* y *Tc80*. Este resultado indica que ambas secuencias son adecuadas para realizar dichos estudios a pesar de la diferencia observada en el nivel de expresión de GAPDH en amastigotes.

7.5 Análisis *in silico* de la secuencia flanqueantes 5' del ARN mensajero de *Tc53* y *Tc80*.

Pensando en la posibilidad de una regulación postranscripcional a nivel de eficiencia de *trans-splicing* y poliadenilación, así como en la caracterización molecular de *Tc53* y *Tc80*, analizamos *in silico* la secuencia flanqueante 5' de estos genes, para saber si existían más de un sitio putativo aceptor del *trans-splicing*. Esto sería importante principalmente para el caso de *Tc80* debido al inesperado aumento del nivel de su ARNm observado en los parásitos AsTc80 (Figura 15).

Los resultados obtenidos muestran 5 probables sitios aceptores del *trans-splicing* en el caso de *Tc53* (Figura 15A), este es un gen de copia única en el

genoma del parásito. Mientras que, para el caso de *Tc80* se encontró que el alelo TCCLB.503395.20 tiene 17 sitios putativos aceptores del *splicing* (Figura 15B), mientras que para el alelo TCCLB.506181.30 encontramos 13 sitios putativos aceptores del *trans-splicing* (Figura 15C).

(A)

```
TCATCCTTTTCAGAGCACACTGCTGGGGCAGCAACTGCGCTACCTTTGCTCTCAGGAGCTGTAGCCATGGAAAACCAGTAC
CCCAAAGCATGCAAACACGCACATACACACGAAAAGGCAGCGACAAAAAGAAACGTGCACGTTTGCCCGTATTAGTGTG
TTTGATGTTTAAATGTTTTTTTTTTTTTTGGTTCTGTCTCTGTGTCCTTTTTTTTTTTTTTTGTGCTTGCTTCTGCTGC
TGTGGGCGTGTGATATTCACGGCGTTTTCTCTCTTTTTTCCATATATATATATATCTCCTGTTCTTTGCGTCCCTGCAAA
AAGTGGAGCGAGCCCTTCGGGAACACAGCCAAGATGGTTCTGCTGACGGTAAAGGGCACGATGTTCCCTGATGAATTTACT
TTTGAATGCACGGCCCAACGTCCATTTCCCGGAGTTGGCGCGCCAGTTGTGCCACATCCAGAACGCCCGTCATCAGGTG
AAGCTGCAGCTGCTCTGCCCCGTAACCTGCTGGAGGAGGCAAGGCGGAGCGGGGTTGGACGCCTTCGGTTCAACCGAC
GACGCCCTTACTTCCACGGAGGCCATTTGAGGAGGTATCCACACGCCTGAAGGACAAAAATAAACAGTACAGTTGGAG
GAGTTCGACCATGACGGGAGAACTGCGTGAAATGACAGAGAACTTTTTCCGGAGGAGTGTCTCTTTCCGAGGGAGGC
CGAGACGGCGTGTGCGAGCGACTTTACGCGCTACACGACAACCCCGACATTTGACGAAGACTACCGGCTTGTGTGTACCAC
TGCCGTGCCATTCTTGACAAGCGGTGGAAGCAGCAGGAGCTTCAGCGGGAGGACGAGGCCGGGTTGTGGTTTTGCGGCAAA
CTGATGGAAGGCACCATCTCGAAGTATAGCGGGCGAAACGAGAAAGAGTGCCTCAGGTTGAAGTCCATCCAAAGGACGGG
GCGGCGCTTAGTATAGAGCCGCGGATGAGTTATGATGACCAGCGTGCCTCTTTGAGAGGATGCGTCAGCGACGCGAGGAG
TACAAGACTCTTGAAGAGTCTGAGTTGCGGGAAAAAGTGTGGCTCAGTCACGGGGCAGGGTTGTCTTGATGTCGCGTCT
GTCTCAGGGGGAGTGCAGTGGACATGTCGCGGCTGCGGCCATTTGCCCTCGGAAGGAAGAAAACGACGTACGTAATAT
TGAGCCGGCTGTGAGTTCACCGCTTAGATGCAAAAAAGACTGCGTGGAATGATGGTGTGTGAATTGGGCGTATGGGCA
CCGGGTGTGCGGCTGCTGCTCACTGCCCGTTTCTCCAGAGGTGAAGTGAGGAATCCAATAGAGCCGCCATAAGACTGTAA
```

(B)

```
CCCTCAGGAGGTGACGGCCCGGATAAATATCCCGTCTACGAGAAAAGCCACAATGGCAGCAGCAGGGGAGGGAGGCAA
GAAGAAACACACTACCCCCAGCATGGCAGCGCAGAACACAGGGAGAAGTTTTAGTCACACTCAGTGTTCACGGAGGGGA
TAGGAGAAAAAGCATCCGCTGTTTGAAGGAACAGTTATTCAGACTTTTGCCCTTTTTTTTTTGCCCTATAGGAGTGGGTGA
ATACACACACACAGACACCTACAATATATATATATATATATATATATAGTACGTGTGTGATATCCTCATGCAGAGTACTGT
ATGCATTTGATTTGAAGACCAACAATTTGCCCTTTCAAGTTAACCCCTTCGTTTTTTAATTCGTGTTGTTGTTGCGGGTGC
CTTTACGTTATCATAAATGCAAAAAAAGAAAGAAAACAACTAAGAAGAAAATCATTCTGTGAGTTATGCGTT
TTTTTCTCATTTTTAATTTGGACTCTTGCTCTTGCAACACCACAGTCTTTCCGAGGGTAGCAGTTTGTAGTAGTCCGTG
GATCATGCAGCAGCCCGCTCACTGAGCGTCAGCGCACCTCCCGCTCCTGTGATTAACGTCGGGTACCGGTTAAGCTCAC
ATATGAGGAGGTGCGGCGTGCAGCCATGTTTTCGGTGCTCGACGACTTTGCCTCTCAAAGCAGTACAAGTGCCGTGTCCA
GCGCCTAAAGGATGTGGGCGGCAACGTGCAGGTGATTTCCCAATCCGGCCGTGGACACGGTGGAGGCCGCGCAAGGGGAG
CTCGACAAGGCTGCTGCGAGAGCATTCCAGCGCCTCATGGAGTGTGTACTTCTACCAGTGGAGTTTGTGTTGGTCTGACTAG
CATCTCCTCGGTGGCAACGGCGATGGGGTTTTATCTCACCATCTACCACAACCGCATGTTCTTGCCACTCGGCCCAATGGC
CGCCGCGGTGACGTGGCGTCTCTGGGATCTACTGGAGGCGGCGTGGGAGCAGCAGCGGTATATCGACAACGCCGCGCGCCT
GCGTGACTCGCGCAAGGGCAATCCGATGAATTTGGTAGCGAAGCGCACTGCTTCTCAGGAGGAAGTGGAGCCGTTGGAGGA
GATGATGTGAGCCACTGCAGCCGATGTTTCATCAAGCAAAAAAAGTATGATGAGTGAAGAACCGCCCGCTTCTCCAT
CAAAAGGAAGGAGGTAGCCTTCGCGCTGAAACTTCTGCTCGACCCACCCCTATTTGTGTTACTAGCATTTTCTTCTTG
```

Figura 15. Análisis *in silico* de los sitios putativos de *trans-splicing* de los genes *Tc53* y *Tc80*. En la figura se observan las secuencias génicas 5'→3' de los genes *Tc53* (A), *Tc80* (B) y el alelo de *Tc80* (C), marcando los probables sitios aceptores del *splicing* en rojo, los trectos de polipirimidias en azul y el marco de lectura abierta de los genes en verde.

Estos resultados indican que para ambas secuencias existe la posibilidad del uso alternativo de *trans-splicing*, lo que permitiría una regulación más compleja de la expresión del gen. Además, en el caso de *Tc80* al ser un gen de dos copias (98% de homología) y que en ambas copias existe la posibilidad de un uso alternativo de sitios de *trans-splicing*, la regulación del nivel del ARNm puede ser aún más compleja. Cabe mencionar que la secuencia antisentido de *Tc80* en teoría es factible que bloquee la expresión de las dos copias del gen [Woolf y col. 1992].

(C)

```
CTCCAGGAGGTGACGGCCCCGCGATAATATTCCCGTTCTACGAGAAAAGCCACAATGGCAGCAGCAGGGGAGGGAGGCAAGA
AGAAACACACTACCCCCCAGCATGGCAGCCAGAACGCGAGGGAGAAGTTTTAGTCACACTTCACTCTTCACGGAGGGGATA
GGAGAAAAGCATCCGCTGTTTGAAGGAACAGTTATTCACGTCCTTTTGCCTCTTTGTTTTGTTTTGCGTCGTGGAGTGGAT
GAATACAAGCAGACAGACACCTACAATATATATATACGTGTGTGTGACATCCTCATGCAGAGTACTGTATGCATTTGATT
TGGTGAAGACCAACAATTTGCCCTTCCAAGTTAACCCCTTCGTTTTTTTAAATTTCTGTTGTTATTGCCGGTGCCTTTACG
TTATCATAAATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAACAACAAAGAAGAAAAATCATTCTGTGAGTTATGCGTTTTTTTC
CCCATTTTTATTTGGACTCTTGCTCTTGCAACACCACAGTCTTTCCGAGGGTAGCAGTTGTAGTAGTTTGTGGATCAT
GCAGCAGCCTGCGTCACTGAGCGTCAGCGCACCTCCCGCTCCTGTGATTAACGTGCGGTACCGGTGAAGCTCACATATGA
GGAGGTGCGGCGTGCAGCCATGTTTTCGGTGCTCGACGACTTTGCTTCTCAAAGCAGTACAAGCGCCGTGTCCAGCGCCT
AAAGGATGTGGGCGCAACGTGCAGGTGATTTCCCAATCCGGCCGTGGACACGGTGGAGGCCGCGCCAAAGGGGAGCTCGAC
ACGGCTGCTGCGAGAACATTCAGCGCCTCATGGAGTGTATACTTCTACCAGTGGAGTTTGTGTTGGTCTGACTAGCATCTC
TTCGGTGGCAACGGCGATGGGGTTTTATCTCACCATCTACCACAACCGCATGTTTTTGCCTCGGCCCAATGGCCGCGCG
GGTGACGTGGCGTCTCTGGGATCTACTGGAGCGGCGTGGGAGCAGCAGCGGTACATCGACAACGCGCGCCTGCGTGA
CTCGCGCAAGGGCAATCCGATGAATTTGGTAGCGAAGCGCACCGCTTCTCAGGAGGAAGTGGAGCCGTTGGAGGAGATGAT
GTGAGCCACTGCAGCCGATGTTTCATCAAGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAATCACTGAAGAAGCCGCCCTTCTCCACCA
AAAGGAAAGAGGTTAGCCTTCGCCGCTGACACCTCTGCTCGCCCCACCCCTATTTGTGTTACTAGCATTTTCTTCTGTGC
```

Figura 15 (Continuación). Análisis *in silico* de los sitios putativos de *trans-splicing* de los genes *Tc53* y *Tc80*. En la figura se observan las secuencias génicas 5' → 3' de los genes *Tc53* (A), *Tc80* (B) y el alelo de *Tc80* (C), marcando los probables sitios aceptores del splicing en rojo, los trectos de polipirimidias en azul y el marco de lectura abierta de los genes en verde.

7.6 Evaluación de la capacidad de crecimiento de los parásitos AsTc53 y AsTc80.

Ya que se tenían los parásitos *KD* de *Tc53*, procedimos a evaluar el fenotipo de estos parásitos. Además, también evaluamos el fenotipo de los parásitos AsTc80 por tres razones: 1) por un lado los experimentos de *RT-qPCR* tiempo real fueron difíciles de obtener por lo que de manera simultánea se estuvieron realizando

también los ensayos para evaluar el fenotipo de los parásitos, en donde se encontraron resultados interesantes por mostrar antes de saber el resultado del aumento en el nivel del transcrito de *Tc80*, 2) El aumento del 32% en el transcrito de *Tc80*, aun cuando no lo podemos explicar por el momento, podría tener un impacto en el fenotipo de los parásitos en el caso de que también se está aumentando la proteína (experimentos de sobre-expresión), que nos pudiera dar una idea de la posible función de la proteína, obviamente a reserva de saber que está pasando con el nivel de la proteína en experimentos futuros, y 3) que hasta no demostrar lo contrario, existe la posibilidad de que se esté bloqueando la traducción de la proteína por la presencia del antisentido aun cuando el mensajero no haya disminuido [Pelechano y Steinmetz, 2013], lo que nuevamente se tendrá que evaluar en trabajo futuro.

El primer parámetro a evaluar fue la capacidad de crecimiento de los parásitos transfectantes. Para esto, se pusieron cultivos de parásitos con un inóculo inicial de 1×10^6 de parásitos en 1 mL de medio *LIT* y se cuantificó su crecimiento durante 10 días. El control de este experimento fueron los epimastigotes transfectados con GFP y con el vector sin inserto (pTREXn).

Se observó que los epimastigotes *KD* para *Tc53* presentan un crecimiento normal en comparación con los controles (*MOCK* y GFP). Sin embargo, los epimastigotes *AsTc80* presentaron un retardo en su crecimiento logarítmico aunque alcanzaron un número de parásitos similar y al mismo tiempo que el resto de los parásitos evaluados (Figura 16).

Este resultado indicó que los parásitos *KD* de *Tc53* no tienen un defecto en crecimiento como era esperado y que los parásitos *AsTc80* muestran un defecto en crecimiento.

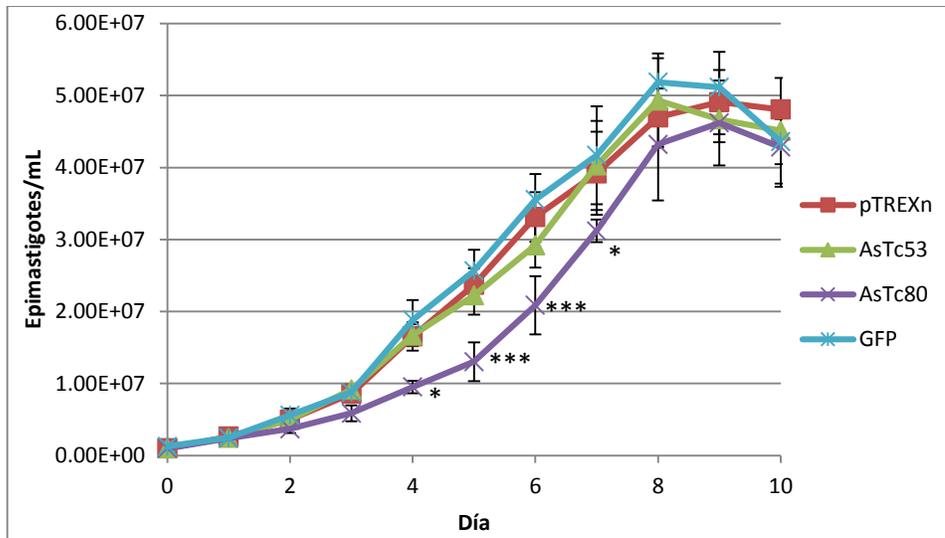


Figura 16. Curva de crecimiento de los epimastigotes *KD* de *Tc53* y *AsTc80* en comparación con los parásitos *MOCK* y los que expresan *GFP*. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$. $n = 3$ (cada experimento hecho por triplicado).

7.7 Evaluación de la diferenciación extracelular de los parásitos *KD* de *Tc53* y transfectantes estables *AsTc80* en comparación con los parásitos *MOCK*.

Ya que las secuencias en estudio fueron obtenidas de una biblioteca de sustracción durante la amastigogénesis del parásito, procedimos a evaluar el fenotipo de los parásitos en estudio y controles en el proceso de diferenciación de *T. cruzi*. Para esto primero se realizó un ensayo de diferenciación extracelular mediante infecciones de fibroblastos 3T3 NIH. Para ello se iniciaron infecciones primarias con epimastigotes transfectados y control, por ser la fase de crecimiento en cultivo del parásito. Se utilizó medio DMEM alta glucosa con 2% de suero, en donde los epimastigotes se transforman en amastigotes y tripomastigotes en el sobrenadante de las células infectadas y se determinó el porcentaje de transformación al cuantificar el número de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes a las 48 horas post-inoculación.

Como se observa en la figura 17, los parásitos *KD* de *Tc53* mostraron una menor eficiencia de transformación de epimastigotes a tripomastigotes (31.3%) y a amastigotes (61.2%) con respecto a los controles (sin transfectar y transfectados con pTREXn y/o pTREXn-GFP). Del mismo modo, los parásitos AsTc80 solo mostraron una menor eficiencia de transformación de epimastigotes a amastigotes (40.1%) con respecto a los controles. Como era esperado, los parásitos sin transfectar y transfectados con pTREXn y/o pTREXn-GFP, no mostraron ninguna diferencia en su eficiencia de diferenciación.

Estos resultados, indican una participación de *Tc53* en la transformación de epimastigote a tripomastigote y amastigote y una participación de *Tc80* en la transformación de epimastigote a amastigote de *T. cruzi*, sugiriendo una posible función en la diferenciación del parásito.

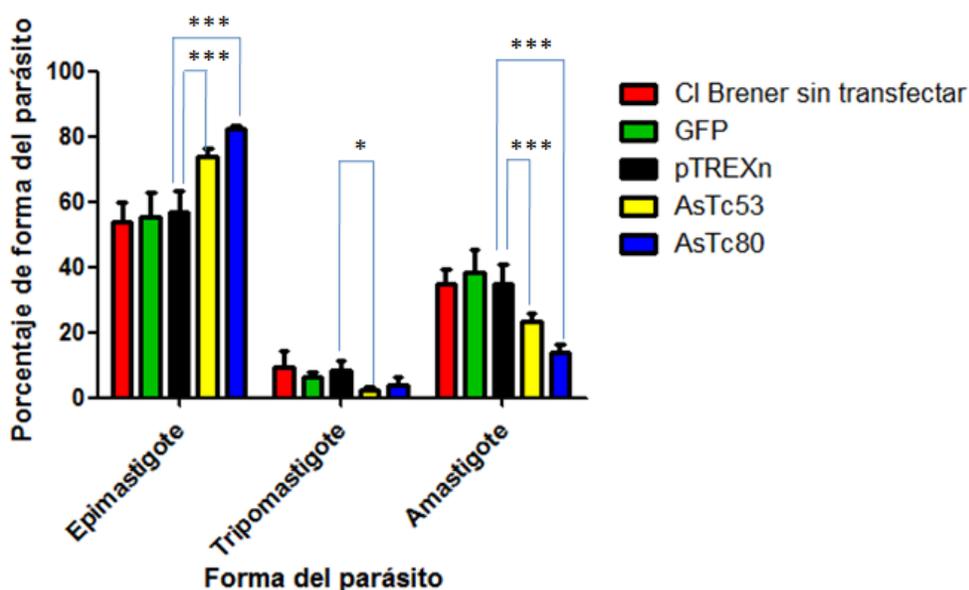


Figura 17. Diferenciación extracelular de los parásitos *KD* de *Tc53* y parásitos AsTc80 en comparación con los parásitos control sin transfectar, *MOCK* y GFP. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$. $n = 3$ (cada experimento hecho por triplicado).

Para la realización de los experimentos se usó la cepa CL Brener, que es una clona obtenida de la cepa CL de *T. cruzi* aislada de *Triatoma infestans* en Rio

Grande, Brasil (Brener y Chiari, 1963). El mismo comportamiento observado en los parásitos control, sin transfectar y transfectados con el vector (pTREXn) o expresando una secuencia no relacionada y teóricamente inocua (pTREXn-GFP), reflejan la naturaleza clonal de la cepa de parásitos que se utilizaron para obtener los parásitos transfectantes. Este resultado apoya que las diferencias observadas de la población de parásitos AsTc53 y AsTc80 analizados son reales, aunque no se descarta que en trabajos futuros se realice la clonación y análisis de clones en busca de un efecto de dosis en el fenotipo.

7.8 Evaluación de la metaciclologénesis de los parásitos *KD* de *Tc53* y transfectantes estables AsTc80 en comparación con los parásitos *MOCK*.

Continuando con la caracterización de los parásitos *KD* de *Tc53* y transfectantes estables AsTc80, se llevaron a cabo ensayos de metaciclologénesis *in vitro*. Para ello los epimastigotes se pusieron en medio *TAU3AAG* y se siguió su cinética de diferenciación a tripomastigotes metacíclicos como se describe en materiales y métodos.

Como se observa en la Figura 18 y 19, los parásitos control (sin transfectar, *MOCK* y GFP) no mostraron diferencias significativas al igual que los parásitos transfectados estables con AsTc80, observándose en todos los casos una cinética de diferenciación similar. Por el contrario los parásitos *KD* de *Tc53* mostraron niveles 9 veces menores de diferenciación con respecto a los controles. En el caso de los parásitos control GFP, se observó una ligera disminución en su eficiencia de metaciclologénesis (30%), sugiriendo que posiblemente la expresión de la proteína verde fluorescente pudiera tener un efecto negativo en este fenotipo del parásito. Este efecto deletéreo no se observó cuando se evaluó el crecimiento y la transformación extracelular de epimastigotes a tripomastigotes y amastigotes, sugiriendo que el efecto negativo no es generalizado. Con los resultados que se tienen hasta el momento no es posible dar una explicación a tal comportamiento,

pero resultados similares han sido obtenidos en otros trabajos de investigación, en donde se ha considerado que la expresión de la proteína verde fluorescente puede llegar a tener un efecto nocivo.

Estos resultados en conjunto indicaron que la proteína codificada por *Tc53* tiene una participación en el proceso de metaciclogénesis del parásito mientras que la proteína codificada por *Tc80* no.

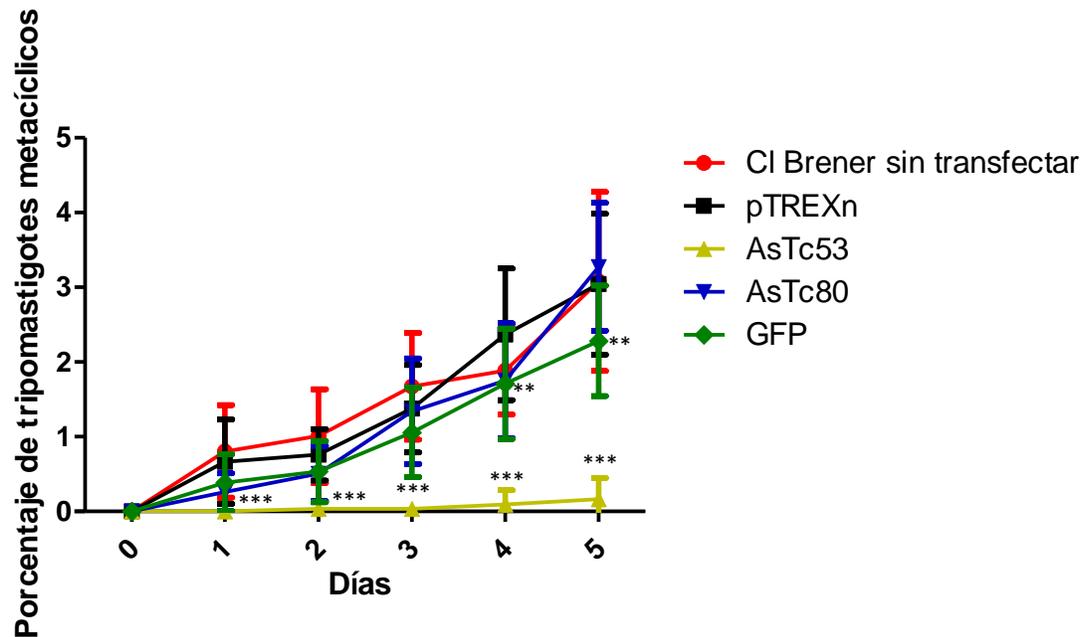


Figura 18. Ensayo de metaciclogénesis de los parásitos *KD* de *Tc53* (AsTc53) y AsTc80 en comparación con los controles *MOCK*. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$. $n = 3$ (cada uno por duplicado).

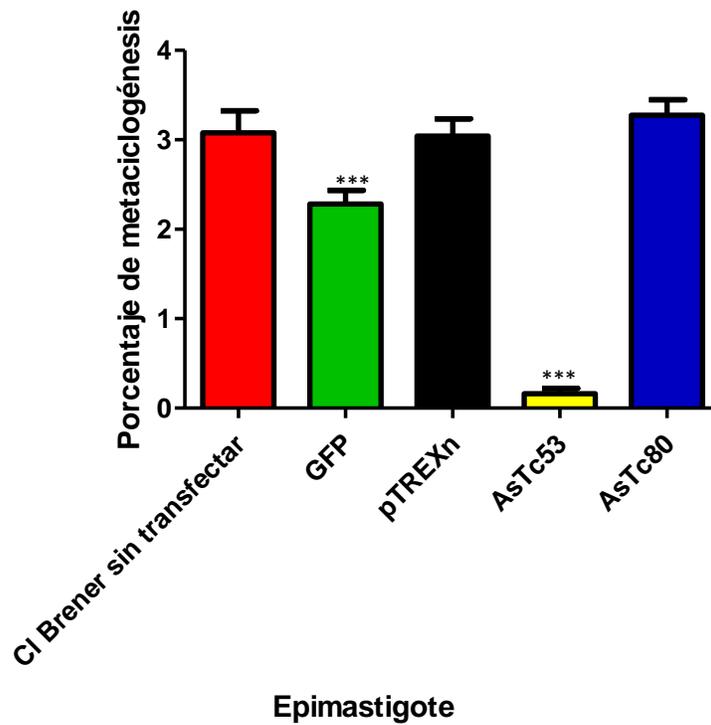


Figura 19. Diferenciación a tripomastigote metacíclico de los parásitos *KD* para Tc53 (AsTc53) y los parásitos AsTc80 en comparación con los controles *MOCK* al día 5 del experimento. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$. $n = 3$ (cada experimento fue hecho por duplicado).

8. DISCUSIÓN.

T. cruzi es un protozoario parásito hemoflagelado que tiene un ciclo de vida digénico entre un hospedero invertebrado y un hospedero mamífero. Durante este ciclo de vida, el parásito sufre varios procesos de diferenciación que le permiten adaptarse a los cambios que se enfrenta al pasar de un microambiente de un hospedero a otro. Esta diferenciación celular le permite al parásito sobrevivir y establecer la patogenicidad de la enfermedad en el humano.

Entre los procesos de diferenciación que hay en el parásito se encuentra la amastigogénesis, que es el proceso de diferenciación intracelular de una forma de vida extracelular móvil y no replicativa (tripomastigotes) a una forma de vida intracelular replicativa (amastigote). A pesar de su importancia en el desarrollo de la enfermedad de Chagas, se conoce poco de los mecanismos que participan en este proceso.

En nuestro laboratorio estamos interesados en entender los mecanismos involucrados en el proceso de infección intracelular y la diferenciación del parásito. Por ello, como un primer paso, se generó una biblioteca de sustracción de formas intermedias de la amastigogénesis secundaria del parásito con respecto a tripomastigotes derivados de células infectadas en cultivo. Esto permitió la identificación de 36 genes que se expresan de forma diferencial en una forma intermedia de la amastigogénesis secundaria del parásito, por lo que podrían tener algún papel funcional en este proceso. Entre estos genes, se encuentran *Tc53* y *Tc80*, que son los genes en estudio en este trabajo de investigación.

El análisis *in silico* de las secuencias de *Tc53* y *Tc80* indicó que no tienen homología con genes conocidos en las bases de datos del *NCBI*. Esto se realizó buscando proteínas y genes que tuvieran una alta identidad y homología conservada con los genes en estudio. Para profundizar más en este análisis, se disminuyó la astringencia del análisis, realizando análisis comparativos de las secuencias proteicas y tomando en cuenta los porcentajes de similitud solo del fragmento de la secuencia con el que alineaba, primero contra todas las proteínas presentes en la base de datos (Tabla 2 y 4) y posteriormente comparando contra proteínas de referencia de *Saccharomyces* (Tabla 3 y 4). Se decidió realizar este segundo análisis contra la levadura porque ésta es un modelo de estudio del cual

existe una gran cantidad de información y su cercanía a *T. cruzi* es mayor con respecto a los otros modelos de estudio presentes en la base de datos. Esto significa que los resultados obtenidos en este segundo análisis podrían tener una mayor relación y significado que los resultados del primer análisis. No obstante, decidimos realizar los dos análisis a la vez, para no descartar posibles funciones que pudiesen tener las proteínas codificadas por estos genes.

Los análisis bioinformáticos realizados sugirieron que *Tc53* probablemente codifica para una proteína que puede tener funciones de unión a calcio (Tabla 2) o de metabolismo de fosfatos (Tabla 3). Las proteínas que identificó la primera parte de este análisis; así como, las proteínas que se unen a calcio, conservan el dominio DUF2870 (Tabla 5). Este dominio está presente en *Tc53*, lo que eleva la posibilidad de que la proteína codificada por *Tc53* tenga la misma función o una función relacionada. Como sabemos los procesos de invasión del parásito están asociados a cascadas de calcio intracelulares tanto en la célula del hospedero como en el mismo parásito [Fernandes y Andrews, 2012] y también se ha sugerido que los procesos de diferenciación celular de *T. cruzi* se encuentran asociados a cambios en las concentraciones de calcio intracelular [Alves y Colli, 2007]. También se encontró que las proteínas identificadas en la segunda parte de este análisis con similitud a *Tc53*, tienen una similitud en la región del sitio activo de las fosfatasas y cinasas de *Saccharomyces* (Tabla 3 y 4). Este resultado es significativo, ya que se ha comprobado tanto en tripanosomátidos como en eucariontes superiores, que procesos de fosforilación y desfosforilación median la diferenciación y especialización celular mediante activación e inhibición de cascadas celulares y factores de transcripción [Augusto y col., 2015; Tonelli y col., 2011 y Szöör, 2010]. Una parte importante que se debe de tomar en cuenta, es que una similitud del 42% (Rtg2p) y 56% (Yvh1p) puede no parecer significativa a primera vista, pero se han realizado trabajos en donde se ha visto que los tripanosomátidos son un grupo de eucariontes que pueden tener sus propios dominios de fosfatasas y cinasas aún sin identificar y que tienen una similitud baja con respecto a los otros grupos de eucariontes [Szöör y col., 2006]. Al tener la pista de una probable función de *Tc53*

en la diferenciación del parásito, obtuvimos el parásito *KD* para este gen (Figura 13) y evaluamos su fenotipo.

El fenotipo presentado por los parásitos *KD* de *Tc53* mostró que éstos tienen una deficiencia en su diferenciación de epimastigotes a tripomastigote sanguíneo (59.7% de disminución), a tripomastigote metacíclico (94.6% de disminución) y a amastigote (38.8% de disminución), en comparación con los parásitos control *MOCK* (Figura 17 y 19). Estos resultados sugieren que *Tc53* pudiera estar participando en los tres procesos de diferenciación (metaciclogénesis, tripomastigogénesis y amastigogénesis) de *T. cruzi* y que dichos procesos comparten un mecanismo común en cuanto a la función de *Tc53*. Resultados similares se han reportado para *GSK3* en *Dictyostelium* [Schilde y col., 2004], en donde se ha observado que esta proteína regula la diferenciación del protozoario a distintas formas especializadas que le permiten la formación del cuerpo fructífero.

Si *Tc53* está participando en la diferenciación del parásito, a través del metabolismo de fosfatos, unión a calcio o por una actividad de fosfatasas y cinasas, será necesario evaluar estas actividades enzimáticas realizando ensayos con la proteína recombinante de *Tc53*. Esto mediante ensayos de metabolismo de fosfatos en presencia de inhibidores o de desfosforilación de parafenil fosfato (pNPP) [Nascimento y col., 2003] y ensayos de fluorescencia de unión a calcio con quin2 [Tatsumi y col., 1997].

Cabe señalar que no esperamos ver un abatimiento total en la diferenciación en los parásitos *KD*, ya que con el método de silenciamiento de genes utilizado se ha reportado que se produce una disminución de hasta el 40% de la expresión del gen blanco, lo que es suficiente para ver un defecto en función en que participa la proteína en estudio [Allaoui y col., 1999].

De la misma forma, se encontró que la proteína codificada por *Tc80*, tiene similitud con la superóxido dismutasa *SOD2* de *Toxoplasma gondii* (Tabla 2) y con *Rrg1p* de *Saccharomyces* (Tabla 3). Ambas proteínas, tienen una localización mitocondrial, lo que concuerda con los resultados del análisis *in silico* de secuencias de localización de *Tc80*, que indican su probable localización mitocondrial (Tabla 5). A este respecto, se ha reportado que en *Leishmania*, existen cambios en la

capacidad reductora de la superóxido dismutasa en el parásito, que promueven la acumulación de radicales peróxido y promueven su amastigogénesis [Mittra y col. 2013]. Además, se ha comprobado en *T. cruzi* que alteraciones en el balance oxidoreductor de la célula, promueven la diferenciación de epimastigote a tripomastigote metacíclico [Nogueira y col. 2015].

Con estos antecedentes, decidimos caracterizar la función de Tc80 siguiendo la misma estrategia de generación de parásitos *KD*. Aun cuando se observó la expresión del transcrito antisentido exógeno (Figura 12), no se detectó disminución del transcrito endógeno (Figura 14). Por el contrario se observó un inesperado aumento del nivel del transcrito de *Tc80* (Figura 14). Este resultado es contradictorio, si consideramos que el principal mecanismo de acción del ARN antisentido es la degradación del transcrito blanco [Pelechano y Steinmetz, 2013]. Sin embargo, este resultado consideramos pudiera deberse a diversas posibilidades. La primera, en donde es posible que el efecto del *KD* disminuyera el transcrito y esto activara un mecanismo de autoregulación, como ya ha sido demostrado con otros genes en otros sistemas [Pelechano y Steinmetz, 2013], y que al final diera como resultado un mayor nivel de ARNm de *Tc80*. Esta regulación podría ser a nivel postranscripcional, tras el uso alternativo de sitios aceptores de *trans-splicing* y poliadenilación, que modificaran la estabilidad del mensajero, debido a que como sabemos los tripanosomatidos no llevan a cabo regulación transcripcional [Kramer, 2012]. Para evaluar esta posibilidad, realizamos un análisis *in silico* de las regiones flanqueantes de *Tc80* (Figura 15B y 15C) y observamos que ambas copias del gen tienen sitios alternativos putativos de *trans-splicing* (alelo TCCLB.503395.20: 17 sitios putativos aceptores del *trans-splicing* / alelo TCCLB.506181.30: 13 sitios putativos aceptores del *trans-splicing*). Por lo tanto, al activarse una autorregulación y haber un nivel mayor de ARNm endógeno, la cantidad de transcrito antisentido exógeno sería posiblemente insuficiente para disminuir el nivel de expresión *Tc80*. Debido a que no es posible realizar la predicción teórica de posibles sitios de poliadenilación, la posibilidad de un uso alternativo de éstos no fue evaluada *in silico* en este trabajo de investigación. Por lo tanto tendría que evaluarse el uso alternativo de los sitios aceptores del *trans-*

splicing y poliadenilación por ensayos de extensión 5' y 3', así como de *RT-PCR* y secuenciación de los productos de amplificación.

Otra posibilidad, es que aun cuando no se observe disminución del ARNm endógeno de *Tc80*, si exista una disminución en el nivel de la proteína, como ya ha sido reportado previamente en la literatura [Pelechano y Steinmetz, 2013]. Esta hipótesis tendría que ser evaluada en experimentos futuros, por ensayos de *western blot*. También será necesario determinar los niveles del transcrito y de la proteína de *Tc80* en los distintos estadios de desarrollo y FI del parásito, ya que en algunos de éstos si se podría estar llevando a cabo el abatimiento del transcrito y/o la proteína. Finalmente, en caso de que el nivel de la proteína *Tc80* también este aumentado en los parásitos *AsTc80* (debido a un posible mecanismo de autorregulación), habría que evaluar experimentalmente si el fenotipo está asociado al aumento en la expresión de *Tc80*.

De manera interesante los parásitos transfectados *AsTc80*, mostraron un defecto en crecimiento (Figura 16) y diferenciación (Figura 17), lo que apoya la posibilidad de que son parásitos *KD* y por lo tanto la posibilidad de existencia de alguna de las hipótesis anteriores. Estos resultados también sugieren que *Tc80* pudiera tener una participación en el crecimiento de *T. cruzi*. Además, el hecho de que *Tc80* al parecer participa en la amastigogénesis (Figura 17) pero no en la metaciclogénesis (Figura 18), sugiere que, al menos en lo referente a *Tc80*, codifica para una proteína que tiene un papel importante durante la amastigogénesis.

En el caso de *Tc80*, se encontró cierta homología con superóxido dismutasas. Estas enzimas, se sabe que ejercen su función a través del control de radicales de oxígeno (que son altamente tóxicos en altas concentraciones) y que participan en el proceso de diferenciación celular [Nogueria y col., 2015]. Se ha reportado también, que las superóxido dismutasas participan en la estabilidad del genoma mitocondrial. En este sentido, una disminución de superóxido dismutasa repercutiría en la pérdida de la estabilidad del cinetoplasto, lo que provocaría una diferenciación deficiente. El cinetoplasto de *T. cruzi*, sufre cambios importantes en su localización y morfología durante la diferenciación a las distintas formas del ciclo de vida del parásito [Teixiera y col., 2006]. Por lo tanto no sería extraño que una

deficiencia de este tipo de enzimas, afectara la diferenciación de *T. cruzi*. Evidencia adicional, también se ha reportado en estudios realizados en *T. brucei*, en donde se han visto cambios en el nivel de expresión del ortólogo de *Tc80*, durante la diferenciación del parásito [Kabani y col. 2009].

Para validar lo anterior, serán necesario realizar experimentos futuros con la proteína recombinante de Tc80, evaluando su posible actividad enzimática sobre radicales de oxígeno a través del uso de ensayos colorimétricos, utilizando a la enzima xantin oxidasa y *kits* de detección de aniones superóxido, como ya ha sido reportado en la literatura [Mitra y col., 2013]. También se puede evaluar, si Tc80 tiene una participación en la estabilidad mitocondrial del parásito. Para ello se podrían realizar ensayos de microscopia confocal con parásitos *KD* de *Tc80* teñidos con DAPI durante el ciclo de desarrollo del parásito. Este tipo de experimentos han sido realizados con éxito en levaduras, en donde se observó que células carentes de Rrg1p perdían al estructura del genoma mitocondrial [Merz y Westermann, 2009].

9. CONCLUSIONES.

1. *Tc53* participa en la diferenciación de *T. cruzi*, en su transformación de epimastigotes a amastigote, a tripomastigote sanguíneo y a tripomastigote metacíclico, sugiriendo un papel común en los distintos procesos de diferenciación del parásito.
2. *Tc80* aparentemente participa en la diferenciación de epimastigote a amastigote de *T. cruzi*.
3. El análisis *in silico* de *Tc53* sugiere que esta proteína participa en el proceso de diferenciación de *T. cruzi* posiblemente a través de una función de unión a calcio o de metabolismo de grupos fosfato, mientras que *Tc80* probablemente lo hace a través de una función relacionada al metabolismo de radicales de oxígeno en la mitocondria del parásito.

10. PERSPECTIVAS.

- i. Analizar por *Western blot*, el nivel de Tc53 y Tc80 en los parásitos transfectados estables con pTREXn-AsTc53 y pTREXn-AsTc80.
- ii. Confirmar la función de *Tc53* y *Tc80* en la amastigogénesis mediante ensayos de amastigogénesis secundaria *in vitro*.
- iii. Evaluar con la proteína recombinante de Tc53, su posible actividad en el metabolismo de fosfatos en presencia de inhibidores o de parafenil fosfato (pNPP) y de unión a calcio con ensayos con quin2.
- iv. Evaluar con la proteína recombinante de Tc80, su posible actividad enzimática sobre radicales de oxígeno a través del uso de ensayos colorimétricos, utilizando a la enzima xantina oxidasa y *kits* de detección de aniones superóxido.
- v. Confirmar la localización celular de las proteínas codificadas por Tc53 y Tc80 en los parásitos mediante proteínas recombinantes con la proteína verde fluorescente y mediante inmunofluorescencia.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Allaoui, A., C. Francois, et al. (1999). Intracellular growth and metacyclogenesis defects in *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele. *Mol Microbiol* 32(6): 1273-1286.
2. Alves MJ, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB life*. 2007 Apr-May;59(4-5):274-9. PubMed PMID: 17505965.
3. Andrews NW, Hong KS, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental parasitology*. 1987 Dec;64(3):474-84. PubMed PMID: 3315736.
4. Aramini JM, Huang YJ, Cort JR, Goldsmith-Fischman S, Xiao R, Shih LY, et al. Solution NMR structure of the 30S ribosomal protein S28E from *Pyrococcus horikoshii*. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2003 Dec;12(12):2823-30. PubMed PMID: 14627742. Pubmed Central PMCID: 2366990.
5. Arts HH, Knoers NV. Current insights into renal ciliopathies: what can genetics teach us? *Pediatric nephrology*. 2013 Jun;28(6):863-74. PubMed PMID: 22829176. Pubmed Central PMCID: 3631122.
6. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Feb 17;101(7):2034-9. PubMed PMID: 14766963. Pubmed Central PMCID: 357047.
7. Augusto L da S MN, Prata RTC, Leandro de Jesus C, Zhang M, Castilho BA y Schenkman S. A Membrane-bound eIF2 Alpha Kinase Located in Endosomes Is Regulated by Heme and Controls Differentiation and ROS Levels in *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Pathogens*. 2015.
8. Bastin P, Sherwin T, Gull K. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature*. 1998 Feb 5;391(6667):548. PubMed PMID: 9468133.
9. Beard CA, Saborio JL, Tewari D, Krieglstein KG, Henschen AH, Manning JE. Evidence for two distinct major protein components, PAR 1 and PAR 2, in the paraflagellar rod of *Trypanosoma cruzi*. Complete nucleotide sequence of PAR. *The Journal of biological chemistry*. 1992 Oct 25;267(30):21656-62. PubMed PMID: 1400477.
10. Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Current molecular medicine*. 2008 Sep;8(6):510-8. PubMed PMID: 18781958. Pubmed Central PMCID: 2859714.

11. Brener Z. [Symposium on new approaches in research on American trypanosomiasis]. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana Pan American Sanitary Bureau. 1977 Aug;83(2):106-18. PubMed PMID: 142492. Simposio sobre nuevos enfoques en la investigación de la tripanosomiasis Americana.
12. Cavalcanti DP, Shimada MK, Probst CM, Souto-Padrón TCBS, de Souza W, Goldenberg S, et al. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. BMC Microbiology. 2009;9(120).
- de Godoy LM, Marchini FK, Pavoni DP, Rampazzo Rde C, Probst CM, Goldenberg S, et al. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. Proteomics. 2012 Aug;12(17):2694-703. PubMed PMID: 22761176.
13. de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. International journal of cell biology. 2010;2010. PubMed PMID: 20811486. Pubmed Central PMCID: 2926652.
14. Fernandes MC, Andrews NW. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. FEMS microbiology reviews. 2012 May;36(3):734-47. PubMed PMID: 22339763. Pubmed Central PMCID: 3319478.
15. Ferrao PM, de Oliveira FL, Degraeve WM, Araujo-Jorge TC, Mendonca-Lima L, Waghbi MC. A phosphoproteomic approach towards the understanding of the role of TGF-beta in *Trypanosoma cruzi* biology. PloS one. 2012;7(6):e38736. PubMed PMID: 22719930. Pubmed Central PMCID: 3373645.
16. Florencio-Martinez L, Marquez-Duenas C, Ballesteros-Rodea G, Martinez-Calvillo S, Manning-Cela R. Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. Experimental parasitology. 2010 Nov;126(3):332-6. PubMed PMID: 20433833.
17. Gamarro F, Osuna A, Castanys S, Perez-Lopez MI, Ruiz-Perez LM. Isolation and purification of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured vero cells. Zeitschrift fur Parasitenkunde. 1985;71(1):15-7. PubMed PMID: 3885604.
18. Gonzalez J, Ramalho-Pinto FJ, Frevert U, Ghiso J, Tomlinson S, Scharfstein J, et al. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. The Journal of experimental medicine. 1996 Nov 1;184(5):1909-18. PubMed PMID: 8920878. Pubmed Central PMCID: 2192890.
19. Hernandez-Osorio LA, Marquez-Duenas C, Florencio-Martinez LE, Ballesteros-Rodea G, Martinez-Calvillo S, Manning-Cela RG. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and

molecular analysis of intermediate developmental forms. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:283842. PubMed PMID: 20037731. Pubmed Central PMCID: 2796335.

20. Hirsch JA, Schubert C, Gurevich VV, Sigler PB. The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell*. 1999 Apr 16;97(2):257-69. PubMed PMID: 10219246.

21. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*. 2005 Jun;6(4):279-84. PubMed PMID: 15815687.

22. JA D. New in vitro approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi*-vertebrate cell interaction. In *New Approaches in American Trypanosomiasis Research*. Pan American Health Organization Science Publication. 1975;318(109-145).

23. Jensen BC, Ramasamy G, Vasconcelos EJ, Ingolia NT, Myler PJ, Parsons M. Extensive stage-regulation of translation revealed by ribosome profiling of *Trypanosoma brucei*. *BMC genomics*. 2014;15:911. PubMed PMID: 25331479. Pubmed Central PMCID: 4210626.

24. Kabani S, Fenn K, Ross A, Ivens A, Smith TK, Ghazal P, et al. Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of ARNm alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. *BMC genomics*. 2009;10:427. PubMed PMID: 19747379. Pubmed Central PMCID: 2753553.

25. Kierszenbaum F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clinical microbiology reviews*. 1999 Apr;12(2):210-23. PubMed PMID: 10194457. Pubmed Central PMCID: 88915.

26. Kolev NG, Tschudi C, Ullu E. RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. *Eukaryotic cell*. 2011 Sep;10(9):1156-63. PubMed PMID: 21764910. Pubmed Central PMCID: 3187059.

27. Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Molecular and biochemical parasitology*. 2012 Feb;181(2):61-72. PubMed PMID: 22019385.

28. Krieger MA, Goldenberg S. Representation of differential expression: a new approach to study differential gene expression in trypanosomatids. *Parasitology today*. 1998 Apr;14(4):163-6. PubMed PMID: 17040736.

29. Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *The Journal of experimental medicine*. 1988 Aug 1;168(2):649-59. PubMed PMID: 3045248. Pubmed Central PMCID: 2189010.
30. Lorenzi HA, Vazquez MP, Levin MJ. Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 2003 May 22;310:91-9. PubMed PMID: 12801636.
31. Lugo-Caballero C, Ballesteros-Rodea G, Martinez-Calvillo S, Manning-Cela R. Identification of protein complex associated with LYT1 of *Trypanosoma cruzi*. *BioMed research international*. 2013;2013:493525. PubMed PMID: 23586042. Pubmed Central PMCID: 3613072.
32. Lukes J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic cell*. 2002 Aug;1(4):495-502. PubMed PMID: 12455998. Pubmed Central PMCID: 117999.
33. Maga JA, LeBowitz JH. Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod. *Trends in cell biology*. 1999 Oct;9(10):409-13. PubMed PMID: 10481179.
34. Manning-Cela R, Jaishankar S, Swindle J. Life-cycle and growth-phase-dependent regulation of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. *Archives of medical research*. 2006 Jul;37(5):593-601. PubMed PMID: 16740428.
35. Merz S, Westermann B. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome biology*. 2009;10(9):R95. PubMed PMID: 19751518. Pubmed Central PMCID: 2768984.
36. Militello KT, Refour P, Comeaux CA, Duraisingh MT. Antisense RNA and RNAi in protozoan parasites: working hard or hardly working? *Molecular and biochemical parasitology*. 2008 Feb;157(2):117-26. PubMed PMID: 18053590.
37. Minning TA, Weatherly DB, Atwood J, 3rd, Orlando R, Tarleton RL. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC genomics*. 2009;10:370. PubMed PMID: 19664227. Pubmed Central PMCID: 2907688.
38. Mitra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler PJ, Andrews NW. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *The Journal of experimental medicine*. 2013 Feb 11;210(2):401-16. PubMed PMID: 23382545. Pubmed Central PMCID: 3570109.

39. Nardelli SC, Avila AR, Freund A, Motta MC, Manhaes L, de Jesus TC, et al. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Eukaryotic cell. 2007 Feb;6(2):337-45. PubMed PMID: 17158738. Pubmed Central PMCID: 1797946.
40. Nascimento M, Abourjeily N, Ghosh A, Zhang WW, Matlashewski G. Heterologous expression of a mammalian protein tyrosine phosphatase gene in *Leishmania*: effect on differentiation. Molecular microbiology. 2003 Dec;50(5):1517-26. PubMed PMID: 14651635.
41. Navarro MC, De Lima AR, Askue J, Contreras VT. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2003 Jan;98(1):83-91. PubMed PMID: 12700866.
42. Nogueira NP, Saraiva FM, Sultano PE, Cunha PR, Laranja GA, Justo GA, et al. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. PloS one. 2015;10(2):e0116712. PubMed PMID: 25671543. Pubmed Central PMCID: 4324650.
43. Pabinger SRS, Kriegner A., Vierlinger K. y Weinhäusel A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. Biomolecular Detection and Quantification. 2014;1:23-33.
44. Paim RM, Pereira MH, Di Ponzio R, Rodrigues JO, Guarneri AA, Gontijo NF, et al. Validation of reference genes for expression analysis in the salivary gland and the intestine of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) under different experimental conditions by quantitative real-time PCR. BMC research notes. 2012;5:128. PubMed PMID: 22395020. Pubmed Central PMCID: 3337225.
45. Palczewski K. Structure and functions of arrestins. Protein science : a publication of the Protein Society. 1994 Sep;3(9):1355-61. PubMed PMID: 7833798. Pubmed Central PMCID: 2142942.
46. Pelechano V, Steinmetz LM. Gene regulation by antisense transcription. Nature reviews Genetics. 2013 Dec;14(12):880-93. PubMed PMID: 24217315.
47. Ralston KS, Hill KL. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. International journal for parasitology. 2008 Jul;38(8-9):869-84. PubMed PMID: 18472102. Pubmed Central PMCID: 3210513.
48. RG. EBaM-C. An overview of mammalian cell infection by *Trypanosoma cruzi*: Cellular and molecular basis. Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases. 2007;37(661):291-311.

49. Schilde C, Araki T, Williams H, Harwood A. GSK3 is a multifunctional regulator of *Dictyostelium* development. *Development*. 2004 Sep; 131 (18): 2555-65.
50. Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in parasitology*. 2006 Apr;22(4):168-74. PubMed PMID: 16504583.
51. Szoor B. Trypanosomatid protein phosphatases. *Molecular and biochemical parasitology*. 2010 Oct;173(2):53-63. PubMed PMID: 20594956. Pubmed Central PMCID: 2994645.
52. Szoor B, Wilson J, McElhinney H, Taberner L, Matthews KR. Protein tyrosine phosphatase TbPTP1: A molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes. *The Journal of cell biology*. 2006 Oct 23;175(2):293-303. PubMed PMID: 17043136. Pubmed Central PMCID: 2064570.
53. Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends in parasitology*. 2003 Oct;19(10):447-51. PubMed PMID: 14519582.
54. Tatsumi R, Shimada K, Hattori A. Fluorescence detection of calcium-binding proteins with quinoline Ca-indicator quin2. *Analytical biochemistry*. 1997 Dec 1;254(1):126-31. PubMed PMID: 9398354.
55. Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgraduate medical journal*. 2006 Dec;82(974):788-98. PubMed PMID: 17148699. Pubmed Central PMCID: 2653922.
56. Timms MW, van Deursen FJ, Hendriks EF, Matthews KR. Mitochondrial Development during Life Cycle Differentiation of African Trypanosomes: Evidence for a Kinetoplast-dependent Differentiation Control Point. *Molecular Biology of the Cell*. 2002 Oct;13:3747-59.
57. Tonelli RR, Augusto Lda S, Castilho BA, Schenkman S. Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2alpha is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. *PloS one*. 2011;6(11):e27904. PubMed PMID: 22114724. Pubmed Central PMCID: 3218062.
58. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*. 2001 May 1;31(5-6):472-81. PubMed PMID: 11334932.
59. Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. RNA interference in protozoan parasites. *Cellular microbiology*. 2004 Jun;6(6):509-19. PubMed PMID: 15104593.

60. Woolf TM, Melton DA, Jennings CG. Specificity of antisense oligonucleotides in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992 Aug 15;89(16):7305-9. PubMed PMID: 1380154. Pubmed Central PMCID: 49698.
61. Wu B, Yee A, Pineda-Lucena A, Semesi A, Ramelot TA, Cort JR, et al. Solution structure of ribosomal protein S28E from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Protein science : a publication of the Protein Society. 2003 Dec;12(12):2831-7. PubMed PMID: 14627743. Pubmed Central PMCID: 2366991.
62. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009 Nov;104(7):1051-4. PubMed PMID: 20027478.
63. Zingales B, Araujo RGA, Moreno M, Franco J, Aguiar PHN, Nunes SL, et al. A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015 May;110(3):433-44.

12. ANEXO.

12.1 Anexo 1. Niveles de expresión de GAPDH y L13 en *T cruzi*.

Con el fin de llevar a cabo la determinación del fenotipo *KD* en los parásitos bajo estudio, se seleccionaron como control de carga a los transcritos de los genes endógenos *GAPDH* y *L13* para realizar los experimentos de *PCR* tiempo real.

GAPDH es un gen que codifica para la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, proteína vital durante la glicolisis de la célula al llevar a cabo reacción reversible de gliceraldehído 3 fosfato a 1,3 difosfoglicerato reduciendo NAD^+ para la generación de ATP.

Los niveles de transcrito de *GAPDH* varían a través del ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 20), sobre todo al comparar el nivel de expresión de *GAPDH* en amastigote con respecto las otras formas del ciclo de vida. Sin embargo, este gen ha sido usado como *housekeeping* en experimentos de RT-qPCR en otros trabajos [Paim y col., 2012 y Zingales y col., 2015].

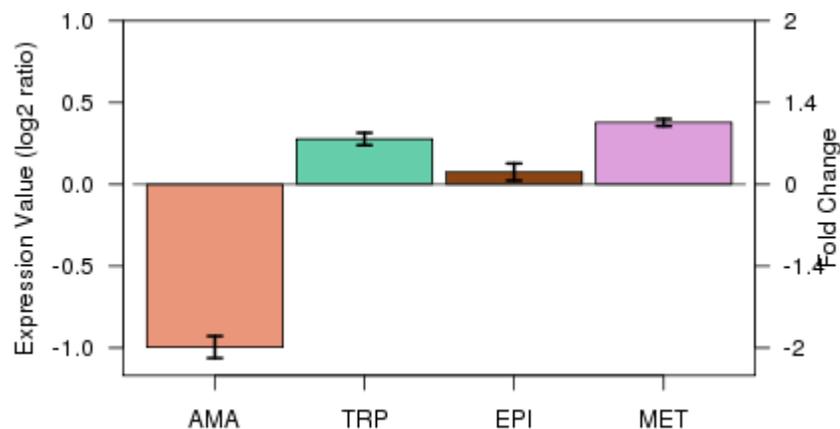


Figura 20. Niveles de transcrito de GAPDH en las distintas fases del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. AMA: amastigote. TRP: tripomastigote sanguíneo. EPI: epimastigote. MET: tripomastigote metacíclico. El resultado se obtuvo mediante ensayos de microarreglos [Tomado de la base de datos de TritypDB, basado en el trabajo de Minning y col. 2009].

L13 es un gen que codifica para una proteína ribosomal que forma parte de la unidad 60S de los ribosomas, lleva a cabo la interacción del ribosoma con los ARNt cargados con aminoácidos.

La expresión de *L13* no presenta diferencia significativa durante las distintas fases del ciclo de vida del parásito, por lo que consideramos que es un control teóricamente más adecuado para llevar a cabo los ensayos de PCR tiempo real (Figura 21).

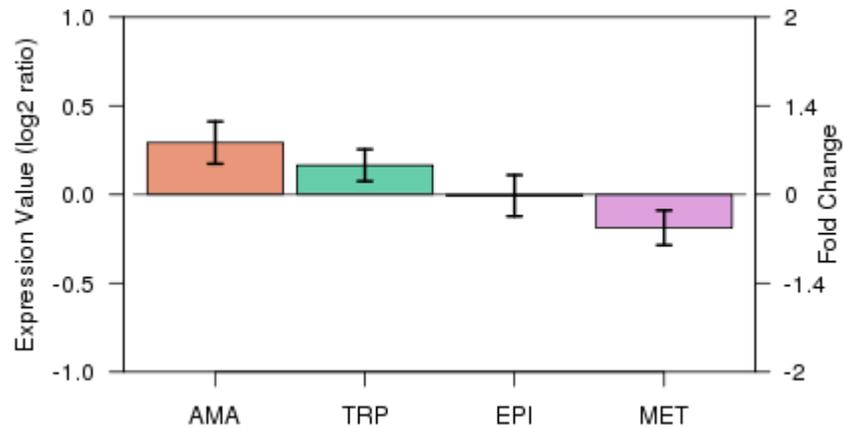


Figura 21. Niveles de transcrito del gen de la proteína ribosomal L13 en las distintas fases del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. AMA: amastigote. TRP: tripomastigote sanguíneo. EPI: epimastigote. MET: tripomastigote metacíclico. El resultado se obtuvo mediante ensayos de microarreglos [Tomado de la base de datos de TritrypDB TcCLB.506405.110, basado en el trabajo de Minning y col. 2009].