



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Caracterización de Tc49 de *Trypanosoma cruzi*

TESIS

Que presenta:

M. en C. Gabriel Noris Sarabia

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

En la especialidad de:

Biomedicina Molecular

Director de la tesis:

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

México, D.F., Febrero de 2016

**Durante el desarrollo de este trabajo, el autor fue becario del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**

Agradecimientos

A la Dra. Rebeca G. Manning Cela, por su apoyo, paciencia y dirección de esta tesis.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda y Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía, por su asesoría, sugerencia y revisión de esta tesis.

Al Sr. Isaías Carrasco “Don Pedro”, Dr. Gilberto Ballesteros Rodea, M. en C. Daniel Sánchez Cruz, Dr. Luis Alberto Hernández Osorio, QFB Claudia Márquez Dueñas, M. en C. Margarita Rubio Ortiz, M. en C. Teresa Itandehui Martínez Cuevas y M. en C. Alberto Antonio Campos, por su apoyo técnico, consejos y los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron para la culminación de este trabajo.

A cada una de estas personas muchas gracias.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado especialmente a mi amada familia, mis padres Felipe y Audencia, mi esposa Daniela y mi hermana Clarissa, quienes han sido el pilar y mi mayor motivación para seguir adelante. Gracias por su amor, confianza y comprensión en cada momento de mi vida.

A ellos doy gracias por creer en mí, por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo incondicional y sus consejos para hacer de mí una mejor persona.

También quiero dedicar este trabajo a esos verdaderos amigos, quienes me han compartido su valioso tiempo y hemos vivido excelentes momentos juntos, gracias por su amistad.

Índice de contenido

Índice de figuras	III
Índice de tablas	V
Resumen	VIII
<i>Abstract</i>	X
I. Introducción	1
1. Antecedentes generales	1
1.1. Enfermedad de Chagas	1
1.1.1. Epidemiología	1
1.1.2. Transmisión	3
1.1.3. Patogénesis	5
1.1.4. Manifestaciones clínicas	6
1.1.5. Diagnóstico y tratamiento	7
1.1.6. Prevención y control	8
1.2. Biología de <i>T. cruzi</i>	9
1.2.1. Taxonomía	9
1.2.2. Morfología	9
1.2.3. Organización estructural	11
1.2.4. Ciclo biológico	13
1.2.5. Proceso de infección	14
2. Antecedentes directos	17
3. Justificación	25
4. Hipótesis	25
5. Objetivo General	25

6. Objetivos Particulares	25
7. Estrategia experimental	27
8. Materiales y métodos	28
9. Resultados	40
10. Discusión	79
11. Resumen de resultados	91
12. Conclusiones	92
13. Perspectivas	93
14. Referencias	94

Índice de figuras

Figura 1	Distribución geográfica de <i>T. cruzi</i>	2
Figura 2	Distribución de la enfermedad de Chagas en México	3
Figura 3	Principales géneros de vectores transmisores de <i>T. cruzi</i>	4
Figura 4	Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas	7
Figura 5	Formas parasitarias de <i>T. cruzi</i>	11
Figura 6	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	14
Figura 7	Esquema del mecanismo de infección de <i>T. cruzi</i> en células no fagocíticas	16
Figura 8	Perfil de expresión de Tb927.4.1910 durante la diferenciación <i>in vitro</i> de <i>T. brucei</i>	24
Figura 9	Perfil de expresión del gen Tb927.4.1910 en formas procíclicas de <i>T. brucei</i> deficientes de TBDRD3	24
Figura 10	Análisis <i>in silico</i> de la región UTR-3' de Tc49 de <i>T. cruzi</i>	24
Figura 11	Obtención de ADNc de FI y de tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	41
Figura 12	Curvas de amplificación de PCR tiempo real de Tc53 y control endógeno GAPDH	48
Figura 13	Calculo de la eficiencia de amplificación de C53 y GAPDH	50
Figura 14	Evaluación de los niveles de expresión de ARNm de Tc49 en los diferentes estadios de desarrollo de <i>T. cruzi</i>	54
Figura 15	Clonación de la secuencia de 70 pb de Tc49 en orientación antisentido en el vector pTREN	58
Figura 16	Secuenciación y alineamiento de la construcción pTREN Tc49 antisentido	59

Figura 17	Determinación de la expresión del transcrito antisentido de Tc49, por RT-PCR	61
Figura 18	Expresión del ARNm de Tc49 en parásitos transfectantes estables	62
Figura 19	Cinética de crecimiento de parásitos <i>knock down</i> de Tc49 de <i>T. cruzi</i>	63
Figura 20	Evaluación de la participación de Tc49 en la diferenciación de <i>T. cruzi</i>	68
Figura 21	Evaluación de la eficiencia de infección de parásitos <i>knock down</i> de Tc49 a las 48 horas post-infección	69
Figura 22	Evaluación del proceso de multiplicación de parásitos <i>knock down</i> de Tc49 a las 48 horas post-infección	71
Figura 23	Evaluación del proceso de multiplicación de parásitos <i>knock down</i> y controles, a los 6 y 8 días post-infección	72
Figura 24	Cuantificación del número de tripomastigotes intracelulares durante la cinética de infección	73
Figura 25	Evaluación de la capacidad de liberación de parásitos <i>knock down</i> y control <i>mock</i> durante una cinética de infección	75
Figura 26	Evaluación del porcentaje de parásitos <i>knock down</i> liberados durante una cinética de infección	76
Figura 27	Metaciclogénesis <i>in vitro</i> de parásitos <i>knock down</i> de Tc49	78

Índice de tablas

Tabla 1	Ortólogos de Tc49 de <i>T. cruzi</i> en tripanosomatidos	23
Tabla 2	Lista de oligonucleótidos para PCR tiempo real	33
Tabla 3	Rango dinámico y eficiencia de amplificación de las clonas de la biblioteca de substracción de FI y control endógeno GAPDH	51
Tabla 4	Corroboración de la expresión diferencial de las clonas de la biblioteca de substracción de FI por una técnica cuantitativa (RT-PCR tiempo real)	53

Lista de abreviaturas

Ab	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Ácido desoxirribonucleasa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa H	Ácido ribonucleasa H
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina de suero bovino
CICs	Cloruro de Cesio
CO₂	Dióxido de carbono
Ct	cycle threshold
DAPI	4´6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DMEM	Medio <i>eagles</i> modificado de Dulbecco
EDTA	Ácido Etilen-diamino-tetra-acético
eIF2α	subunidad α del factor 2 de inicio de la traducción
FBS	Suero Fetal Bovino
FI	Forma intermedia
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato- deshidrogenasa
H₂O-DEPC	Agua dietil pirocarbonato
IP3	Inositol-3-fosfato
LB	Luria bertani

LIT	Medio Liver infusión Triptosa
NaCl	Cloruro de sodio
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polietilenglicol
RDE	representation of differential expression
RT	Reverse transcriptase
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
Ssp4	Proteína de superficie de amastigote
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
T.A.	Temperatura ambiente
TAU	“Triatomine Artificial Urine” Orina artificial de triatómino
TAU3AAG	TAU suplementado con L-prolina, glutamato, aspartato y glucosa
TbDRBD3	Proteína de Unión a ARN de <i>T. brucei</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Thr¹⁶⁹	Treonina en la posición 169
Tris-Cl	Tris
TRN	Tripanina
TS	Transialidasa
UTR-3'	Región sin traducir 3'
UV	Ultravioleta
WHO	World health organization
Wt	Wild type

Resumen

El parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, presenta diferentes formas de desarrollo que se alternan entre el insecto vector y el hospedero mamífero durante su ciclo biológico. Esta alternancia expone al parásito a diferentes condiciones de nutrientes, temperatura y pH, las cuales juegan un papel importante en su proceso de diferenciación. Aun cuando este proceso es determinante para que *T. cruzi* complete su ciclo de vida, sobreviva y establezca la patogénesis de la enfermedad, es poco lo que se conoce de sus proteínas participantes y de los mecanismos moleculares involucrados. A fin de identificar las moléculas que participen en la transición de estadio de *T. cruzi*, en nuestro laboratorio previamente se establecieron condiciones *in vitro* para la obtención y caracterización de las formas intermedias (FI) obtenidas durante la amastigogénesis del parásito y se realizó su análisis de expresión diferencial con respecto a tripomastigotes. Con la finalidad de caracterizar a una de las clonas obtenidas, en este trabajo se realizó la validación y análisis de la biblioteca de substracción para seleccionar al candidato de estudio. Usando como criterios de corte una $E \leq 1 \times 10^{-6}$, ≥ 100 pb de tamaño de secuencia y eliminación de secuencias redundantes, se obtuvieron 17 secuencias diferentes de las 37 inicialmente identificadas (46%). De estas secuencias candidato, se eligió a la clona Tc49, cuya expresión diferencial fue la mayor (3.6 veces más) observada entre las diferentes clonas. Ya que estos resultados sugirieron una posible participación de Tc49 en el proceso de diferenciación de *T. cruzi*, se obtuvieron parásitos *knock down* de Tc49, para evaluar esta hipótesis. Una vez confirmada la expresión del transcrito antisentido y la subsecuente disminución del ARNm endógeno de *Tc49* (50% menos) en los parásitos *knock down*, evaluamos la capacidad de infección y diferenciación de éstos, con respecto a parásitos control *mock* y silvestres. Los resultados no mostraron diferencias entre los parásitos *knock down* y controles en cuanto a su capacidad de crecimiento; así como, en los pasos de entrada del parásito, diferenciación de tripomastigotes hacia amastigotes, multiplicación de amastigotes y diferenciación de amastigotes hacia tripomastigotes, durante la

infección de fibroblastos 3T3NIH en cultivo. Sin embargo, se observó un efecto deletéreo durante la transformación extracelular de los epimastigotes *knock down* a amastigotes (58% menor), en su cinética de infección (40% menos eficiente/1.6 veces menos) y en la salida del tripomastigote de la célula infectada (13.2 veces menos). Estos resultados en conjunto sugieren que Tc49 participa en la amastigogénesis extracelular y salida de *T. cruzi* de células infectadas.

Abstract

The protozoan parasite *T. cruzi*, etiological agent of Chagas disease, presents different developmental forms during its life cycle, that alternate between the insect vector and mammalian hosts. This alternation exposes the parasite to different conditions of nutrient, temperature and pH, which play an important role in *T. cruzi* differentiation process. Although this stage transformation is crucial for the parasite to complete its life cycle, survive and establish the pathogenesis of Chaga's disease, little is known about the proteins and molecular mechanisms involved. In order to identify the molecules that could participate in the parasite transformation process, we previously established in vitro conditions to obtain and characterize the intermediate forms (IFs) obtained during amastigogenesis and also we determined the differential expression profile of IF with respect to tripomastigotes. To characterize one of the differential expressed sequence, in this work we first perform the validation and analysis of the subtraction library to select the candidate of study. Using cutoff criteria of $E \leq 1 \times 10^{-6}$, ≥ 100 bp size sequence and removing redundant sequences for the in silico analysis of an aliquot of the subtraction library, it was determined that 17 of the 37 sequences initially identified (46%), have a significant differential expression in the IF. We select the clone Tc49 for further characterization because this sequence showed the highest differential expression (3.6 fold change). In order to evaluate if the product of *Tc49* participates in the differentiation process of *T. cruzi*, we obtained and characterized knock down parasites expressing an antisense sequence against the mRNA of *Tc49*. Experiments of real time RT-PCR, demonstrated a decreased of 50% of the endogenous mRNA of *Tc49* in the knock down parasites. The phenotypic analysis of knock down and controls parasites, showed no differences in growth, cell invasion, differentiation from trypomastigotes into amastigotes, amastigotes multiplication and differentiation from amastigotes into tripomastigotes, during the infection of 3T3 NIH fibroblasts in culture. However, a deleterious effect was observed during the extracellular transformation from epimastigotes into amastigotes (58% less), infection kinetics (40% less efficient /1.6 fold change) and trypomastigotes exit from the infected cell (13.2 fold change) in the

knock down parasites. These results together suggest that Tc49 is involved in the extracellular amastigogenesis and exit of *T. cruzi* from infected cells.

I. Introducción

1. Antecedentes generales

1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, un parásito hemoflagelado, intracelular obligado, el cual fue descubierto por Carlos Chagas en el año de 1909 durante un proyecto de erradicación de malaria en Minas Gerais, Brasil. Este médico Brasileño, identificó al parásito en la porción media del intestino del insecto conocido como “barbeiros” o “chinche besucona” y le dio su nombre en honor a Oswaldo Cruz. Posteriormente, durante la búsqueda de posibles hospederos vertebrados para este parásito, Chagas encontró el primer caso de infección aguda en humanos por *T. cruzi*, en una niña de dos años de edad llamada Berenice. Carlos Chagas también describió el ciclo biológico del parásito, los insectos que lo transmiten y los reservorios para el parásito en la naturaleza (Chagas C, 1909). A más de cien años del descubrimiento del agente etiológico de la enfermedad, un gran número de investigaciones han contribuido al entendimiento de la biología del parásito, así como la historia natural de la enfermedad, su patogénesis y diagnóstico.

1.1.1. Epidemiología

La enfermedad de Chagas es un problema grave de salud pública que se encuentra distribuida desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina. Aunque la enfermedad es propia del continente americano, se han reportado casos en otros países como Japón, Australia y algunos de Europa. Esto debido principalmente a la migración de personas infectadas y originarias de zonas endémicas de América Latina (Schmunis GA, 1991) (**Figura 1**). De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen alrededor de 16 a 18 millones de personas infectadas, principalmente de las zonas rurales y urbanas más pobres de América latina, 300 mil casos nuevos por año y 50 mil muertes anuales. Se estima que alrededor de 75 a 90 millones de personas están expuestas a contraer

la enfermedad (Coura JR y Dias JC, 2009). En México, en el 2004, durante un estudio sero-epidemiológico se reportaron 14,500 casos confirmados serológicamente, siendo los estados más afectados Jalisco, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y Chiapas (CHAG-MEX, Instituto de Biología, UNAM, <http://www.unibio.unam.mx/chagamex>) (**Figura 2**). A diferencia de la OMS que reporta menos del 1% de personas infectadas con *T. cruzi* en México, algunos estudios muestran que el porcentaje de seropositividad es de aproximadamente 1.6% en población abierta y 1.5% en donadores de sangre, por lo que se ha considerado que en nuestro país la enfermedad pudiera estar subestimada (Guzmán C y cols., 1998; Guzmán-Bracho C, 2001).

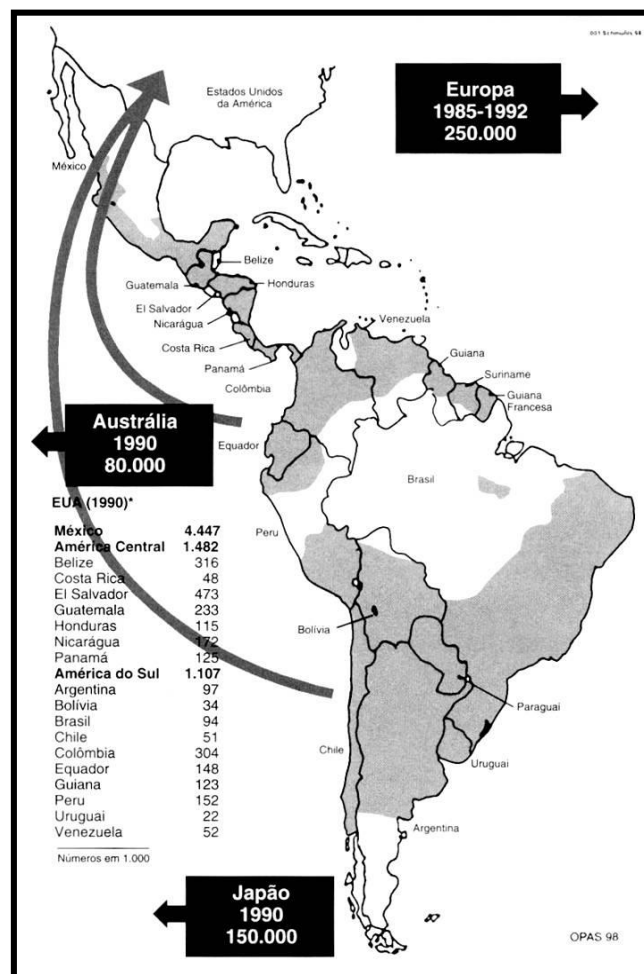


Figura 1. Distribución geográfica de *T. cruzi* (Schmunis GA, 1991).

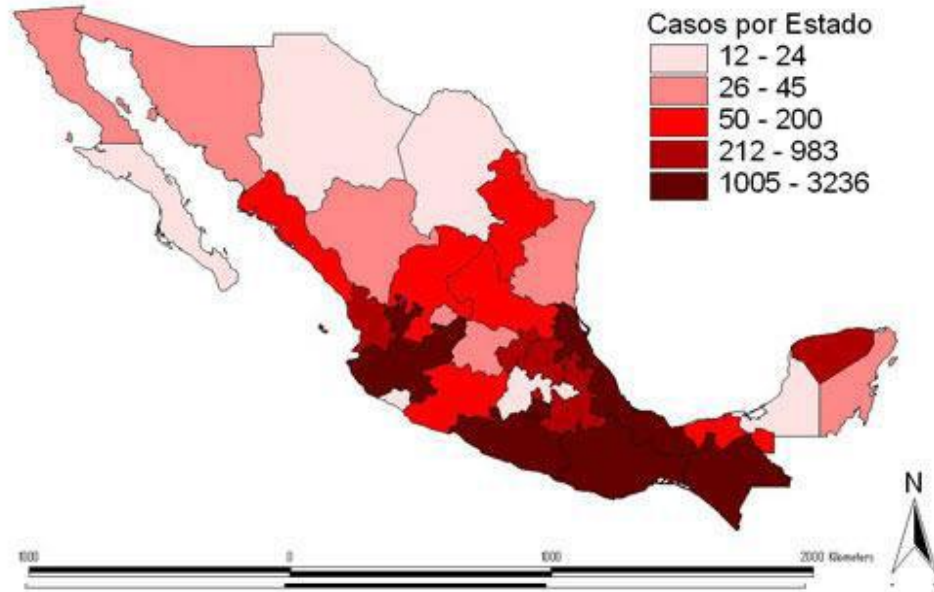


Figura 2. Distribución de la enfermedad de Chagas en México. (CHAG-MEX, Instituto de Biología, UNAM, 2004).

1.1.2. Transmisión

En la actualidad se conocen diferentes maneras de adquirir la enfermedad, la más común es la forma natural, que se da mediante el depósito de heces en el lugar de la picadura del vector o insecto triatómino infectado con el parásito. Existen más de 130 especies de insectos triatóminos pertenecientes al orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*, de las cuales 53 pueden adquirir de manera natural al parásito. En México, existen más de 30 especies de triatóminos de las cuales al menos 10 están involucradas en el proceso de infección en el humano. Los géneros de más importancia epidemiológica para la infección por *T. cruzi* son: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (**Figura 3**), los cuales ingieren al parásito al alimentarse de sangre de mamíferos que contiene parásitos circulantes (Cruz-Reyes A y Pickering-López J., 2006; Buscaglia CA y Di Noia JM, 2003; Da Silva MCF y Silva AE, 2007).

Además de este tipo de transmisión, existen otras vías por las cuales se ha demostrado que se puede adquirir la enfermedad. La transfusión sanguínea ocupa la segunda causa de infección por *T. cruzi* con el 10 % de los casos y en países no endémicos es considerada la primer vía de transmisión (Schmunis GA, 1999; Prata A, 2001). La transmisión de madre al feto es la tercera vía de infección más importante, donde se presentan entre 5,000 a 18,000 casos nuevos por año, con una incidencia del 1 al 10 %. Finalmente otras formas esporádicas de transmisión son la contaminación accidental en el laboratorio, trasplantes de órganos y la transmisión por alimentos contaminados con *T. cruzi* (Prata A, 2001).

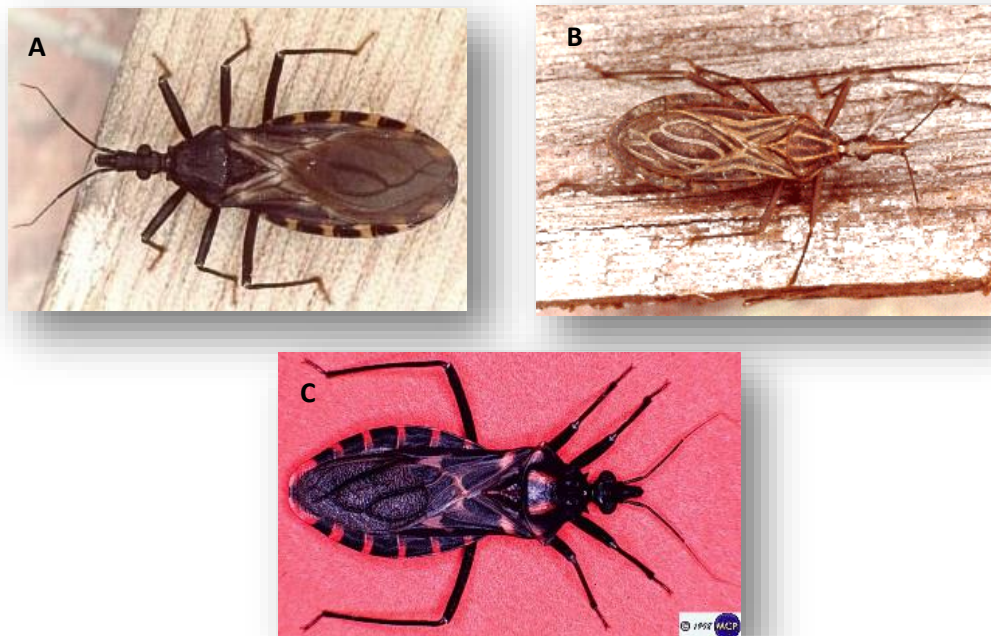


Figura 3. Principales géneros de vectores transmisores de *T. cruzi*. A.- *Triatoma*, B.- *Rhodnius*, C.- *Panstrongylus* (<http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite>).

1.1.3. Patogénesis

La patogénesis de la enfermedad de Chagas es compleja e involucra mecanismos y aspectos como la persistencia del parásito, la autoinmunidad del hospedero y la variabilidad genética del parásito. Se han descrito dos mecanismos patogénicos para la infección por *T. cruzi*, uno de ellos fue descrito por Gaspar Vianna en 1911, el cual consiste en una reacción inflamatoria local con necrosis, destrucción de tejido y cicatrización con fibrosis. El segundo mecanismo es aún más complejo e involucra procesos inmunológicos que aún no han podido explicar por completo la patogénesis de la enfermedad (Teixeira ARL y cols., 1975; Andrade Z, 1999; Tarleton RL, 2003; Coura JR, 2007). El conocimiento sobre la patogénesis de la enfermedad de Chagas ha aumentado conforme se han desarrollado nuevas tecnologías. Con base a éstas se puede dividir en tres fases históricas (Macedo AM y cols., 2004): la primera denominada “fase del parásito”, que corresponde al periodo inmediato posterior del descubrimiento del mismo. Esta etapa fue enfocada principalmente al parásito, existió una intensa búsqueda de marcadores mediante metodologías bioquímicas y biológicas que establecieran una relación entre la variabilidad del parásito y la forma clínica de la enfermedad; sin embargo, se obtuvieron pocos resultados contundentes que pudieran explicar por esta vía la patogénesis de la enfermedad. La segunda etapa denominada “fase autoinmune”, en donde la importancia del parásito fue casi relegada, con excepción de la reacción cruzada de los antígenos del parásito que aparentemente ocasionaban reacciones autoinmunes (Schmunis GA, 1987; Brener Z, 1987; Kalil J y Cunha-Neto E, 1996; Macedo AM y cols., 2004). Con la llegada de tecnologías más desarrolladas surge la tercera etapa denominada “fase genómica”, en la cual se retoma la importancia del parásito, al ser identificado en tejidos de infecciones crónicas mediante el desarrollo de técnicas de inmunohistoquímica (Higuchi ML y cols., 1993) y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que proporcionaron evidencia definitiva tanto bioquímica como molecular en la relación entre la presencia del parásito y las lesiones en tejidos (Jones EM y cols., 1993; Brandariz S y cols., 1995; Vago AR y cols., 1996; Macedo AM y cols., 2004); dejando de manifiesto el papel principal del parásito y estableciendo las bases de que la variabilidad genética de *T. cruzi* puede

influir en el curso de la enfermedad (Macedo AM y cols., 2004). En la actualidad se considera que tanto la autoinmunidad como la presencia del parásito son los dos mecanismos que en conjunto estarían desencadenando el daño al hospedero, llevando a las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas (Tarleton RL, 2003; Bonney KM y Engman DM, 2008).

1.1.4. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas se pueden presentar en dos fases. La primera es la fase aguda, que se observa normalmente en niños y en donde en la mayoría de los casos corresponden a transmisión vectorial. Esta fase se presenta justo después de la infección, donde se puede observar en el lugar de la picadura ocasionada por el vector, una lesión inflamatoria cutánea indurada (Chagoma) (**Figura 4A**). Cuando la transmisión es por inoculación en el área cercana al ojo, se puede presentar conjuntivitis, edema parpebral unilateral y adenopatía preauricular satélite (signo de Romaña) (**Figura 4B**). Las manifestaciones generalizadas de la infección se producen simultáneamente con fiebre, taquicardia, linfadenopatía, esplenomegalia leve y edema, en esta etapa el parásito se encuentra diseminado, observándose mediante examen directo de sangre, desapareciendo el parásito de torrente sanguíneo y con ello la fase aguda, después de 2 a 4 semanas. En la gran mayoría de los pacientes la fase aguda de la enfermedad pasa desapercibida debido a la ausencia o escasez de manifestaciones clínicas, causada por la supresión de la respuesta inmune por el parásito, facilitando su invasión y reproducción (Prata A, 2001). La segunda fase se divide en dos etapas: la primera etapa, indeterminada o latente, puede durar de 10 a 30 años, o incluso toda la vida en donde el individuo infectado no presenta manifestaciones clínicas y la mayoría de las personas infectadas son detectadas en bancos de sangre por la presencia de anticuerpos contra el parásito (Teixeira ARL y cols., 2006). La segunda etapa de la fase crónica denominada sintomática, afecta normalmente a personas de 30 a 45 años de edad, que muestran problemas de insuficiencia cardíaca por daño del tejido muscular, cardíaco o desordenes gastrointestinales como megaesófago y megacolon (**Figura 4C y D**). El

megaesófago se caracteriza por regurgitación, disfagia, ardor y aumento en la salivación, mientras que el megacolon se caracteriza principalmente por constipación y la retención progresiva del bolo fecal, que llevan a la dilatación y engrosamiento del colon (Prata A, 2001; Teixeira ARL y cols., 2006).

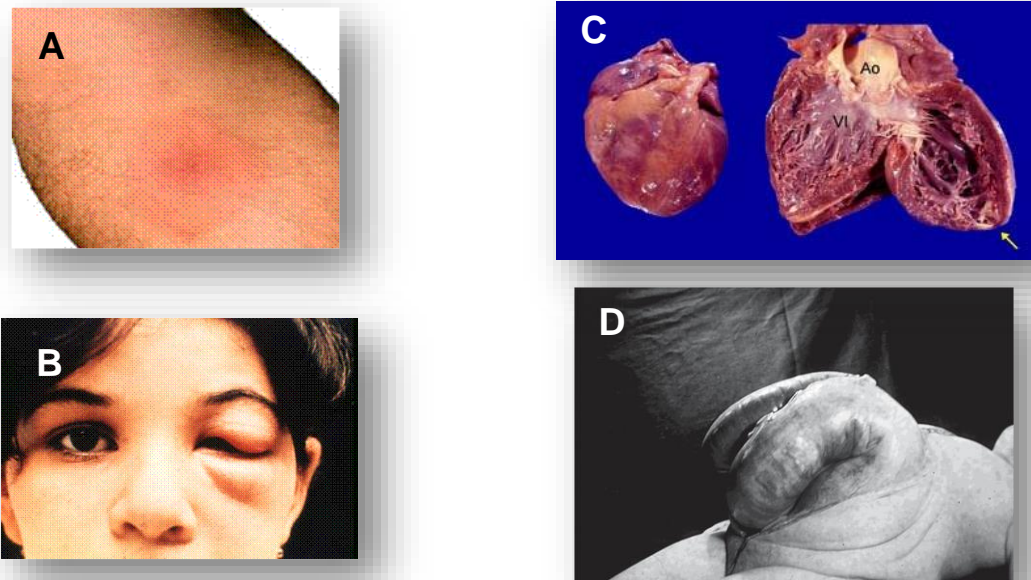


Figura 4. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. A) Chagoma. B) Signo de Romaña. C) Cardiopatía chagásica crónica. D) Megacolon (Aranda-Fraustro A y cols., 2007; Coura JR, 2007; www.facmed.unam.mx).

1.1.5. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la enfermedad en la fase aguda se basa en la demostración de la presencia del parásito en sangre, mediante exámenes parasitológicos directos. Cuando los niveles de parasitemia resultan bajos es necesario usar métodos de concentración de parásitos, como el método Strout. De igual manera existen métodos parasitológicos indirectos de diagnóstico como el xenodiagnóstico y el hemocultivo cuya sensibilidad dependerá del nivel de parasitemia del paciente y solo se realizan en laboratorios especializados. El diagnóstico etiológico de la

enfermedad de Chagas se basa en la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en el suero de pacientes infectados. Este método se utiliza para casi todos los pacientes infectados que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad, en donde predominan los anticuerpos de clase IgG, mientras que en la fase aguda existen más anticuerpos clase IgM. Otros tipos de diagnóstico utilizados son: ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), inmunofluorescencia indirecta, hemoaglutinación indirecta y PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Guhl F y cols., 2002).

Respecto al tratamiento, existen dos fármacos utilizados, principalmente en la fase aguda de la enfermedad, nifurtimox y benznidazole, que empezaron a usarse a finales de los años sesenta, pero que no son completamente efectivos. Además, los efectos adversos de estos fármacos son muy severos causando principalmente anorexia, náusea, vómito y dolor abdominal, así como efectos neurológicos que incluyen insomnio, desorientación, parestesias y polineuritis, neuropatía y supresión de la médula ósea. Para la fase crónica aún no existe un tratamiento que sea satisfactorio (Sosa-Estani S y cols., 2009).

1.1.6. Prevención y control

Erradicar la enfermedad de Chagas es muy difícil debido a que está presente en la naturaleza como una zoonosis y en la actualidad no se cuenta con una vacuna efectiva. El control y la prevención en los últimos años ha radicado en controlar la transmisión del parásito mediante: 1) programas arduos que incluyen la eliminación del ciclo doméstico de *T. cruzi* mediante el mejoramiento y limpieza de las viviendas y el control de las poblaciones de vectores por fumigación y 2) a través del muestreo de bancos de sangre, que como se dijo anteriormente es una fuente de transmisión del parásito muy importante. Estos programas incluyen: la iniciativa del cono sur iniciada en 1991-1992, en donde los países involucrados son Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay y el sur de Perú que se incorporó en 1996-1997. En este programa Uruguay, Chile, gran parte del centro y sur de Brasil han sido certificados como libres de la transmisión. La iniciativa del pacto Andino iniciada en

1997-1998, que incluyen a Venezuela, Colombia, Ecuador y el norte de Perú. Y la Iniciativa de Centroamérica y México iniciada en 1997, donde participan Guatemala, Honduras, Nicaragua, El Salvador, Panamá y México. Aun cuando México está incluido en esta iniciativa, es necesario que inicie con un programa más eficaz para la erradicación de la enfermedad de Chagas. Ya que algunos datos epidemiológicos reportados muestran porcentajes de seropositividad más altos (Guzmán C y cols., 1998; Prata A, 2001; Guzmán-Bracho C, 2001) a los reportados por la OMS que son de menos del 1%. Lo que sugiere que el problema en nuestro país está subestimado y que los programas o iniciativas no han sido suficientes para controlar la enfermedad en nuestro país y sigue siendo un problema de salud pública desatendido.

1.2. Biología de *T. cruzi*

1.2.1. Taxonomía

T. cruzi se ubica taxonómicamente de la siguiente manera: Super-reino: Eukaryota; Reino: Protista; Sub-reino: Protozoa; Phylum: Sarcomastigophora; Sub-phylum: Mastigophora; Clase: Euglenozoa; Orden: Kinetoplastida; Familia: Trypanosomatidae; Género: *Trypanosoma*; Sub-genero: Schizotrypanum; Especie: *T. cruzi*.

1.2.2. Morfología

T. cruzi presenta distintas formas morfológicas o etapas de desarrollo durante su ciclo biológico denominadas: tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo, amastigote y epimastigote. Estas formas de desarrollo pueden ser identificadas en preparaciones teñidas con Giemsa, mediante microscopía de luz. Las características que diferencian una forma de otra son la posición del cinetoplasto en referencia al núcleo y la presencia o ausencia de flagelo (De Souza W, 2002).

El tripomastigote (**Figura 5A**) es un estadio infeccioso no replicativo que presenta forma de tirabuzón, mide alrededor de 20-25 μm de longitud y un diámetro de 1-2 μm y su cinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo hacia la región más posterior del parásito de donde emerge el flagelo, el cual se dobla hacia adelante en forma de "C", formando una membrana tipo ondulante a lo largo del cuerpo. Esta forma de desarrollo se puede observar tanto en el intestino posterior, en las heces y orina del hospedero invertebrado o triatoma (forma metacíclica), así como en células de tejido y sangre del hospedero vertebrado (forma sanguínea).

El epimastigote (**Figura 5B**) es un estadio replicativo en el hospedero invertebrado que presenta una forma alargada, mide alrededor de 20-40 μm de largo y su cinetoplasto se localiza en la región anterior al núcleo hacia la parte media del parásito, de donde surge el flagelo formando la membrana ondulante pero más pequeña que en el tripomastigote. Este estadio se encuentra normalmente en el intestino medio del hospedero invertebrado.

El amastigote (**Figura 5C**) es el estadio intracelular replicativo que presenta una forma redondeada, mide 2-5 μm y su cinetoplasto se observa cercano al núcleo y no posee flagelo o presenta un flagelo muy corto apenas visible. Esta forma se encuentra en células de tejido del hospedero vertebrado (Hoare CA y Wallace FG, 1966; Vickerman K, 1974; Carvalho TU y De Souza W, 1986; Ley V y cols., 1990; Carrada-Bravo T, 2004).

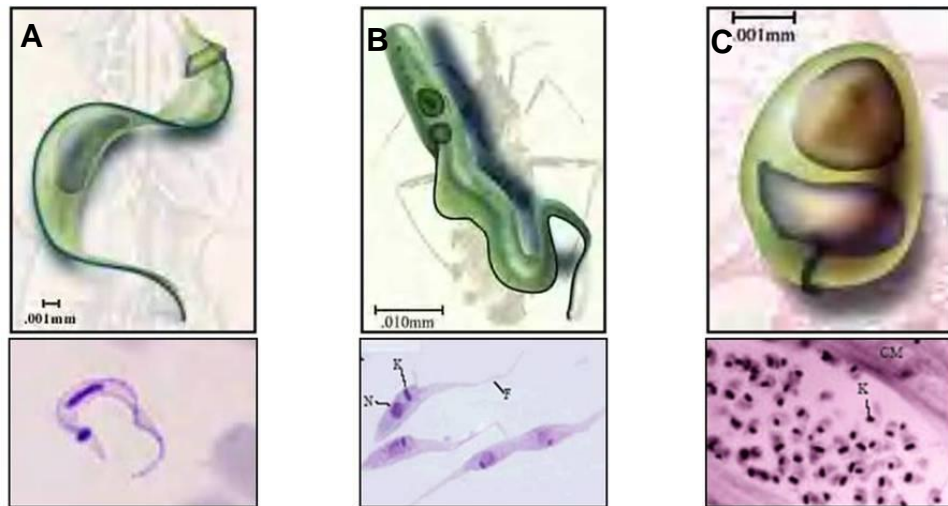


Figura 5. Formas parasitarias de *T. cruzi*. A) tripomastogote. B) epimastigote. C) amastigote. En cada panel se muestra una representación de cada una de las formas de *T. cruzi* (cuadro superior) y tinciones con Giemsa (cuadro inferior) (<http://triatominae.tripod.com/chagasES2.htm>).

1.2.3. Organización estructural

La superficie celular de *T. cruzi* está compuesta por dos estructuras básicas: 1) la membrana plasmática y 2) una capa formada por microtúbulos subpeliculares unidos entre sí, los cuales a su vez se unen a la membrana plasmática por pequeños microfilamentos de naturaleza desconocida. Este corset de microtúbulos forma una red muy intrincada que no permite la entrada ni salida de sustancias del parásito, se localiza y distribuye por debajo de la membrana plasmática y solo está ausente en el sitio donde emerge el flagelo, esta zona es llamada bolsa o saco flagelar. El saco flagelar es una invaginación de la membrana plasmática ubicada en la región anterior del parásito y es el único sitio conocido hasta el momento a través del cual se llevan a cabo los procesos de endocitosis, secreción de proteínas hacia el espacio extracelular, e integración de proteínas de membrana de la superficie del parásito (De Souza W, 2002). *T. cruzi* así como otros tripanosomatidos, posee una estructura llamada mitocondrion que se extiende a lo largo del cuerpo del parásito

y que contiene en la parte cercana al cuerpo basal una red compleja de fibras de ADN llamada cinetoplasto, las cuales están organizadas en filas paralelas al eje longitudinal del parásito. El cinetoplasto posee una forma de disco cóncavo que mide 1 μm de longitud y 0.1 μm de profundidad compuesto por dos tipos de estructuras, los minicírculos y los maxicírculos. Los minicírculos son pequeñas estructuras que miden aproximadamente 0.45 μm de longitud y en una célula se puede encontrar un número de hasta 20,000 a 30,000 copias, asociadas entre sí como estructuras lineales largas. Muestran una heterogeneidad en secuencia y algunas copias pueden codificar ARNs guías que participan en el proceso de edición del ARN de transcritos mitocondriales. Respecto a los maxicírculos, son moléculas grandes que se pueden comparar con el ADN mitocondrial de otros eucariotas y se encuentran en un número bajo de copias (50 copias por célula) que codifican para proteínas, ARNs ribosomales y ARNs de transferencia mitocondriales (De Souza W, 2002). Otras estructuras encontradas en *T. cruzi* son: el núcleo que presenta una forma redonda o elongada dependiendo de su estadio de desarrollo y está localizado en la parte central del parásito; el retículo endoplásmico que se localiza en todo el cuerpo del parásito; el acidocalcisoma, que es un tipo de reservorio de productos metabólicos y cuerpos pigmentados; el peroxisoma, que es un organelo en forma de espiral distribuido de manera azarosa dentro del cuerpo del parásito, entre otros (De Souza W, 2002). Otra estructura que caracteriza a la familia *Trypanosomatidae* es la presencia de un flagelo, el cual emerge del saco flagelar y le otorga movilidad al parásito, esta estructura está compuesta por un axonema formado por microtúbulos en una formación 9+2 (9 pares de microtúbulos periféricos y 1 par central) y una estructura filamentosa altamente organizada llamada barra paraflagelar que se extiende a lo largo del flagelo. La longitud del flagelo varía de acuerdo a la etapa de desarrollo del parásito (De Souza W, 2002).

1.2.4. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *T. cruzi* (**Figura 6**) es complejo e involucra a hospederos invertebrados (vectores) y vertebrados (mamíferos). Inicia cuando el hospedero invertebrado infectado se alimenta con sangre del hospedero vertebrado y deposita sus heces conteniendo tripomastigotes metacíclicos, que como se dijo antes es la forma infectiva para mamíferos entre los que se encuentra el humano. Los tripomastigotes metacíclicos son incapaces de atravesar la piel intacta por lo que logran entrar a través de la fisura hecha por la picadura del triatómino, por escoriaciones en la piel o bien a través de las mucosas de nariz, ojo y boca. Una vez dentro, son capaces de invadir una gran variedad de células tanto fagocíticas como no fagocíticas, en donde el tripomastigote metacíclico es internalizado a través de una vacuola parasitófora y liberado al citoplasma celular, en donde se transforma a amastigote (Andrews NW, 1993; Rodríguez A y cols., 1996; Rodríguez A y cols., 1997; Tyler KM y Engman DM, 2001; Burleigh BA y Woolsey AM, 2002). El amastigote se divide por fisión binaria, se transforma en tripomastigote sanguíneo y se libera tras la ruptura de la célula para infectar células cercanas o alcanzar la circulación sanguínea. Se han observado en torrente sanguíneo tanto formas alargadas con núcleo elongado, cinetoplasto subterminal y flagelo corto; y forma anchas, con núcleo oval, cinetoplasto terminal y flagelo largo, cuya predominancia depende de la cepa de *T. cruzi* y el tiempo de infección (Brenner Z, 1973; De Souza W, 2002; Carrada-Bravo T, 2004). El ciclo se completa cuando el hospedero invertebrado se alimenta de sangre infectada con tripomastigotes, los cuales una vez en el estómago del triatómino se diferencian a epimastigotes, se multiplican por fisión binaria y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el intestino del insecto vector. Finalmente los tripomastigotes metacíclicos son excretados con las heces una vez que se encuentran en el recto del insecto, infectando a un nuevo hospedero vertebrado en la siguiente ingesta sanguínea, completando así un nuevo ciclo biológico (Zeledon R y cols., 1997; De Souza W, 2002).

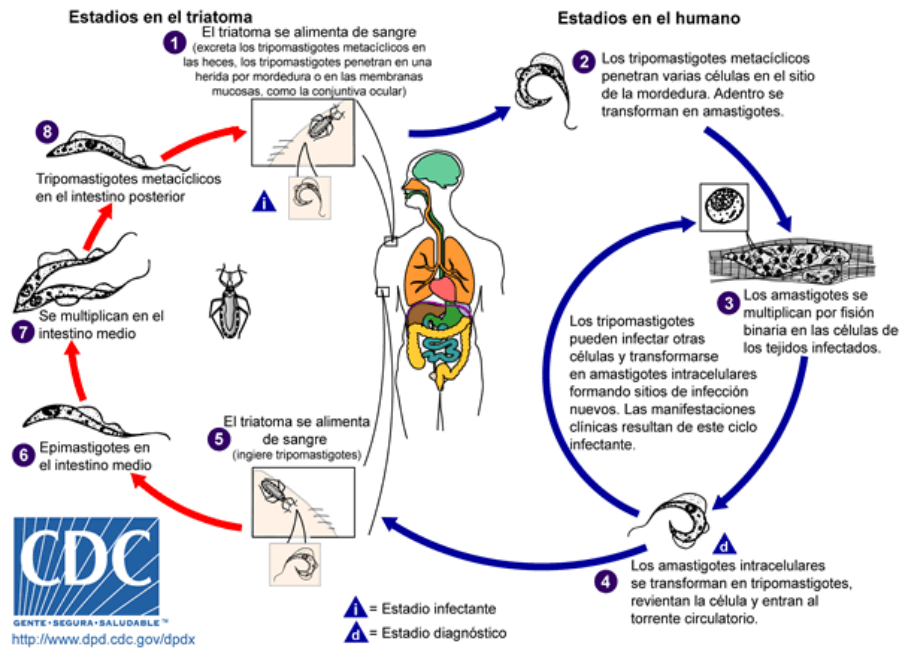


Figura 6. Ciclo biológico de *T. cruzi* (www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1.2.5. Proceso de infección

El proceso de infección celular de *T. cruzi* involucra varios mecanismos aún no bien comprendidos. En un inicio se creía que solo la forma de tripomastigote era la responsable de la infección celular, pero ahora se sabe que también la forma de amastigote es infectiva (revisado en Espinoza-Gutiérrez B y Manning-Cela RG, 2007). *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado capaz de invadir diferentes tipos de células, tanto fagocíticas como no fagocíticas (**Figura 7**). Durante el proceso de infección están involucrados una serie de pasos que se dan secuencialmente, en donde participan tanto moléculas del parásito como moléculas de la célula hospedera. La adhesión es el primer paso e involucra la interacción de diversos ligandos del parásito y receptores de la célula hospedera, por lo que al parecer no depende de la interacción de un solo ligando-receptor. Algunas moléculas descritas específicas para tripomastigotes son las glicoproteínas gp82, gp90 y gp35/50, otras

moléculas compartidos en tripomastigotes y amastigotes como la proteína SA85-1 y otras moléculas específicos para amastigotes como la proteína Ssp-4 (Herrera EM y cols., 1994; Kahn S y cols., 1995; Vieira da Silva C y cols., 2006; Da Silva MCF y Silva AE, 2007; Espinoza-Gutiérrez B y Manning-Cela RG, 2007). Después de la adhesión, el parásito es internalizado mediante diferentes mecanismos que se encuentran aún en estudio y en discusión, en cuanto a la participación o no de los microfilamentos de actina (revisado en Espinoza-Gutiérrez B y Manning-Cela RG, 2007). Todos estos mecanismos resultan en la internalización del tripomastigote dentro de una vacuola parasitófora, cuyas condiciones acidas ayudan a la activación de moléculas secretadas por el parásito, como Tc-Tox (*porin-like*) y LYT1, cuya capacidad lítica aparentemente facilita la salida del parásito de la vacuola parasitófora (Andrews NW y Whitlow MB, 1989; Andrews NW y cols., 1990; Manning-Cela R y cols., 2001; Espinoza-Gutiérrez B y Manning-Cela RG, 2007).

Una vez libre, el parásito se diferencia a amastigote, se multiplica libremente mediante fisión binaria y se transforma en tripomastigote sanguíneo, el cual es liberado hacia al espacio extracelular por la ruptura de la célula, infectando otras células o bien pasando a circulación sanguínea. Estas últimas etapas no han sido estudiadas y aun cuando se conocen los pasos generales del proceso, no se conocen las moléculas que participan ni los mecanismos moleculares involucrados (Brener Z, 1973; Andrews NW, 1993; Manning-Cela R y cols., 2001; Tyler KM y Engman DM, 2001; De Souza W, 2002; Carrada-Bravo T, 2004; Espinoza-Gutiérrez B y Manning-Cela RG, 2007).

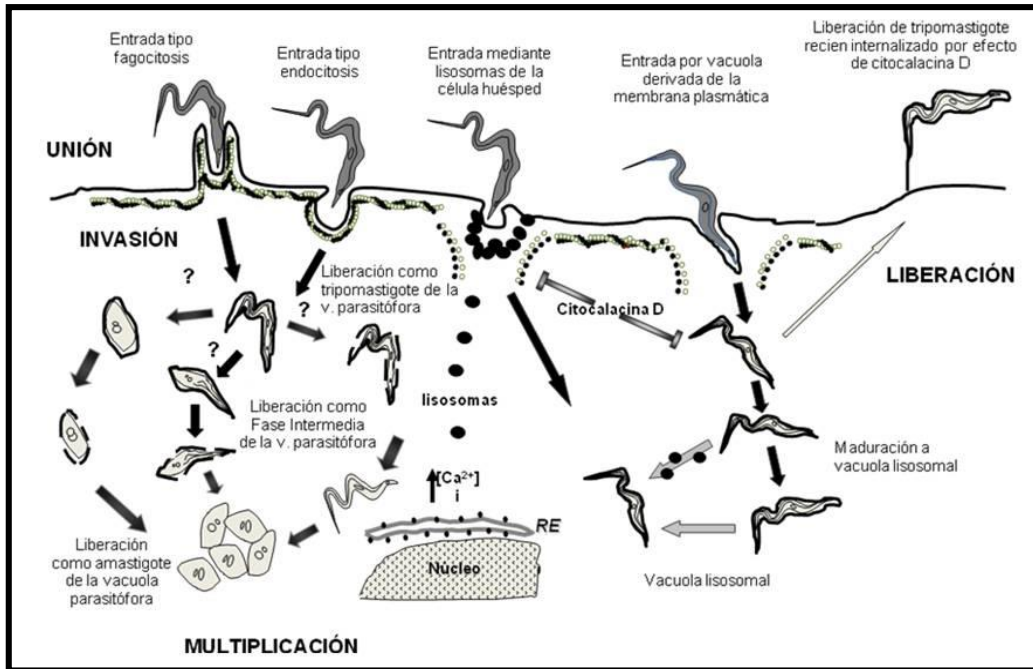


Figura 7. Esquema del mecanismo de infección de *T. cruzi* en células no fagocíticas. (Espinoza-Gutiérrez B y Manning-Cela RG, 2007).

2. Antecedentes directos

2.1. Proceso de diferenciación de *T. cruzi*

Como se describió anteriormente, durante el ciclo biológico de *T. cruzi* se presenta cuatro diferentes formas del parásito que alternan entre el insecto vector y el hospedero mamífero, estas formas son: epimastigote y amastigote que son las formas replicativas, y tripomastigote metacíclico y tripomastigote sanguíneo que son las clásicas formas infectivas. La forma de amastigote y tripomastigote sanguíneo están presentes en el hospedero mamífero, mientras que el tripomastigote metacíclico y epimastigote se encuentran en el insecto vector (De Souza, 2002).

A lo largo del ciclo de vida el parásito está expuesto a diferentes condiciones de nutrientes, temperatura y pH, las cuales juegan un papel importante en el proceso de diferenciación del parásito. Este proceso ocurre naturalmente durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, en donde en el insecto vector el epimastigote se adhiere al epitelio en el recto del triatómino en donde las condiciones de nutrientes son carentes, induciéndose así la transformación del parásito a tripomastigote metacíclico, a través de un proceso llamado metaciclogénesis. Aun cuando no se sabe cuál es el mecanismo que desencadena la diferenciación, sí se sabe que ambos factores antes mencionados, la adhesión y estrés nutricional, juegan un papel importante en la metaciclogénesis (Figueiredo RC y cols., 2000). Por otro lado, los tripomastigotes metacíclicos provenientes del insecto vector y contenidos en sus heces, infectan células del mamífero y se diferencian a amastigotes, por un proceso llamado amastigogénesis primaria. Una vez que los amastigotes se multiplican dentro de la célula éstos se diferencian a tripomastigotes sanguíneos los cuales son liberados al medio extracelular e infectan nuevas células, donde se diferenciarán a amastigotes a través de la amastigogénesis secundaria. Algunos trabajos han demostrado *in vitro* que hay condiciones que desencadenan esta diferenciación, como por ejemplo sometiendo al parásito a estrés fisiológico usando medios suplementados con plasma de pollo, vitaminas, nucleótidos y suero fetal bovino (Kimura y cols., 1978, Rondinelli y cols., 1988). También se sabe que la

temperatura juega un papel importante para la amastigogénesis primaria, ya que el cambio de temperatura entre el insecto y el mamífero es de 10°C.

Diferentes estudios *in vitro* han revelado que distintos factores están implicados en el proceso de metacicloogénesis como: la cepa o clona de *T. cruzi* utilizada, el tiempo del cultivo, la adición de hemolinfa del insecto, la osmolaridad, el pH inicial del medio, el uso de L-prolina y el estrés nutricional (De Lima AR y cols., 2008, Tonelli RR y cols., 2004). La metacicloogénesis *in vitro* se inicia sometiendo a los epimastigotes a un estrés nutricional de proteínas, amino ácidos y azúcares en medio TAU (*Triatomine Artificial Urine*) y posteriormente incubándolos en medio TAU3AAG (TAU suplementado con L-prolina, glutamato, aspartato y glucosa), condiciones en que el epimastigote deja de dividirse y se diferencia a tripomastigote metacíclicos (Cardoso J y cols., 2008). La mayoría de los estudios han utilizado este tipo ensayos de metacicloogénesis *in vitro*, para tratar de dilucidar los mecanismos moleculares y determinar las moléculas implicadas en este proceso de diferenciación. Por ejemplo, Cardoso J y cols. en 2008 y 2011, sugirieron que la inhibición de la actividad del proteosoma en *T. cruzi* bloquea la replicación y diferenciación del parásito. Estos autores demuestran que la proteólisis dependiente del proteosoma ocurre durante la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos. Por ejemplo, la incubación de epimastigotes con lactacistina, que es un inhibidor de proteosomas en todas las especies, resulta en la inhibición del crecimiento celular y la metacicloogénesis *in vitro*. En estudios previos, el uso de lactacistina no funciono para bloquear la diferenciación de la forma sanguínea a la prociclica en *T. brucei* (Mutomba MC and Wang CC, 1998). Sin embargo otros estudios mostraron que la transformación intracelular de amastigotes a tripomastigotes de *T. cruzi* se ve impedida por lactacistina. Estos resultados sugieren que posiblemente los mecanismos que regulan los cambios morfológicos estadio-especifico en protozoos son conservados y son dependientes del proteosoma, y que los inhibidores del proteosoma pueden tener una amplia gama de blancos terapéuticos (Cardoso J y cols, 2008). Sin embargo, aún no se han

podido identificar los posibles blancos de degradación por el proteosoma que pudieran estar participando directamente en el proceso de diferenciación.

Otro tipo de moléculas que se les ha relacionado al proceso de metacicloogénesis son las cistein-peptidasas (Duschak VG y cols., 2006). En este sentido, en el 2011 Ennes-Vidal V y cols., describieron en *T. cruzi* la presencia de proteínas relacionadas a calpaina, que es una cistein peptidasa y que cuando utilizan un inhibidor (MDL28170) de calpaina, se observa que la metacicloogénesis se ve afectada. Sin embargo, no se demostró si calpaina estaba involucrada directamente en la metacicloogénesis.

Así como se han reportado compuestos o moléculas que inhiben la metacicloogénesis, también hay trabajos que demuestran un aumento o inducción en la metacicloogénesis. Por ejemplo, Sangenito LS y cols., en el 2011, utilizando pepstatina A, un poderoso inhibidor de proteasa aspártica, observaron la inducción de la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos, aunque el mecanismo por el cual este inhibidor está participando en el proceso se desconoce. También, en un trabajo reciente se sugiere más directamente un posible mecanismo que participa en la metacicloogénesis (Tonelli RR y cols., 2011). En este reporte se sugiere que eIF2 α (subunidad α del factor 2 de inicio de la traducción) es necesaria para la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos. Estos autores sugieren que la fosforilación en Thr¹⁶⁹ de Tc-eIF2 α controla la metacicloogénesis, ya que una mutación del residuo Thr¹⁶⁹ por Ala impidió la diferenciación (Tonelli RR y cols., 2011). Apoyando estos resultados, también se ha reportado que los epimastigotes que sobre-expresan a Tc-eIF2 α , se diferencian con mayor frecuencia en comparación a los epimastigotes que sobre-expresan Tc-eIF2 α mutada (Tonelli RR y cols., 2011).

Además de la metacicloogénesis, otro de los pasos fundamentales en el ciclo de vida del parásito es la amastigogenesis, que es la diferenciación de tripomastigotes metacíclicos a amastigotes (amastigogenesis primaria) y de

tripomastigotes sanguíneos a amastigotes (amastigogenesis secundaria). La importancia de estos procesos de diferenciación en el hospedero mamífero, radica en garantizar la sobrevivencia del parásito durante su ciclo infectivo intracelular y el establecimiento de la patogénesis de la enfermedad.

Para su estudio algunos investigadores han establecido condiciones para inducir una amastigogenesis *in vitro*, a partir de tripomastigotes sanguíneos obtenidos de infecciones y de tripomastigotes metacíclicos, comparando los cambios morfológicos, moleculares y funcionales del parásito que se llevan a cabo durante la amastigogenesis primaria y secundaria (Navarro MC y cols., 2003). Se terminó que durante la diferenciación morfológica de tripomastigotes sanguíneos a amastigotes se obtienen diversas formas intermedias (FIs) como un paso obligado durante el proceso de diferenciación del parásito (Navarro MC y cols., 2003). Aunque se llevó a cabo la caracterización parcial de las FI, la contaminación de tripomastigotes y amastigotes en las muestras y la gran heterogeneidad de FIs, impidió por varios años el poder hacer estudios de expresión diferencial de las FIs que permitieran la identificación de las moléculas que pudieran estar participando en el proceso de diferenciación de *T. cruzi*.

2.2. Amastigogenesis secundaria *in vitro* de *T. cruzi*, establecida en un trabajo previo en nuestro laboratorio.

En nuestro grupo se estableció un sistema de amastigogénesis secundaria *in vitro*, en donde se obtiene la diferenciación de tripomastigotes obtenidos de infecciones celulares a amastigotes, con la obtención de las diferentes FIs (Hernández-Osorio LA y cols., 2010). Se caracterizaron las FIs obtenidas, determinando los cambios morfológicos y de movimiento del parásito, la expresión de marcadores específicos de estadio, la sensibilidad y resistencia al complemento y la cinética de desplazamiento y cambios morfológicos del núcleo y cinetoplasto. Durante este proceso de diferenciación *in vitro*, se observó una transformación genotípica y fenotípica del parásito que fue altamente sincrónica con la obtención

de diversas FIs. La transformación del parásito se caracterizó por la disminución gradual y progresiva del tamaño del parásito, de su flagelo y de su membrana tipo ondulante, y la aparición paulatina del antígeno de superficie Ssp4 específico de amastigote. Además, también se observó la remodelación gradual del núcleo y el desplazamiento del cinetoplasto de la parte posterior a la anterior del parásito. De igual manera a lo reportado para tripomastigotes y amastigotes, las diferentes FIs fueron resistentes a la lisis por complemento. La cuantificación de las diferentes FIs obtenidas, indicó que se obtuvo un 100 % de FIs desde las 2 horas hasta las 6 horas de diferenciación, indicando la ausencia de tripomastigotes y amastigotes contaminantes (Hernández-Osorio LA y cols., 2010).

2.3. Construcción de una biblioteca de substracción de una FI con respecto a tripomastigotes, obtenida en un trabajo previo en nuestro laboratorio.

El establecimiento de este sistema de diferenciación altamente sincrónico permitió realizar estudios de expresión diferencial de transcritos de una de estas FIs con respecto a tripomastigotes. Como primer paso se obtuvo con éxito una biblioteca de substracción utilizando la técnica de RDE (por sus siglas en inglés *representation of differential expression*), la cual está basada en la amplificación de secuencias de ADNc únicas de una población celular (muestra / FI) después de una hibridación sustractiva con secuencias de ADNc de una población estrechamente relacionada (conductora / tripomastigotes). El análisis inicial de la biblioteca, fue realizado por ensayos de *dot blot* en donde se hibridaron tres membranas idénticas conteniendo el ADN de cada una de las clonas, con ADNc marcado radioactivamente de tripomastigotes, FI y amastigotes. Los resultados de *dot blot* indicaron que 73 clonas se expresan específicamente en FI y 14 clonas que se sobre-expresan en la FI con respecto a tripomastigotes, de un total de 87 colonias analizadas de la biblioteca de substracción (Sánchez-Cruz DG, 2009, Tesis de Maestría). Mediante análisis de secuenciación y estudios *in silico* de las 89 clonas, se logró identificar 13 secuencias que corresponden a proteínas hipotéticas, 7 secuencias con dominios conservados de función conocida y 3 con dominios

conservados de la familia de transalidasas, resultando en un total de 23 proteínas diferentes que son fuertes candidatos para ser evaluados durante el proceso de diferenciación de *T. cruzi*.

2.4. Análisis *in silico* de Tc49 de *T. cruzi*

Como se describirá más adelante, en este trabajo realizamos la validación de la biblioteca de substracción por ensayos de RT-PCR tiempo real y se caracterizó parcialmente a Tc49, una de las clonas identificadas y anotada como hipotética en la base de datos de *T. cruzi*.

Con el objetivo de determinar si la secuencia de Tc49, conserva dominios o secuencias de proteínas con función conocida, realizamos un análisis *in silico* de la secuencia codificante de *Tc49* (No. de acceso XM_811318.1). Este análisis, mostró que Tc49 no presenta dominios ni secuencias conservadas.

También se evaluaron los ortólogos de Tc49 de *T. cruzi* en la base de datos de tripanosomatidos (*TriTrypDB*). Se identificó que Tc49 tiene ortólogos en *T. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. grayi* y *T. evansi* (**Tabla 1**). En todos estos casos los ortólogos identificados, también están anotados como secuencias hipotéticas.

De manera interesante, al analizar con detalle la información de cada ortólogo, identificamos que el ortólogo de Tc49 en *T. brucei* (Tb927.4.1910), está regulado diferencialmente durante la diferenciación de la forma sanguínea hacia la forma procíclica del parásito (**Figura 8**). Estos datos apoyan nuestra hipótesis, de que Tc49 de *T. cruzi* pudiera participar en la diferenciación del parásito.

Por otro lado, datos de expresión del gen de Tb927.4.1910 en la forma procíclica de *T. brucei*, muestran que éste está siendo regulado a la baja cuando la proteína TbDRBD3 está ausente (**Figura 9**). TbDRBD3, es una proteína de unión a ARN que regula un subgrupo específico de transcritos en *T. brucei*, uniéndose a motivos ricos en AU de la región UTR-3' del transcrito blanco (Estévez AM, 2008). En este sentido realizamos un análisis con la finalidad de saber si en *T. cruzi* estaba

presente el ortólogo de TbDRBD3 y además analizamos la región UTR-3' de Tc49, en la búsqueda de motivos ricos en AU. El resultado encontrado reveló que existe una secuencia ortóloga de TbDRBD3 en *T. cruzi*, anotada como una secuencia putativa DRBD3 (TcCLB.506649.80). Además, al analizar la región UTR-3' de Tc49 se identificó un dominio rico en AU (**Figura 10**). Estos resultados abren la posibilidad de que el transcrito de Tc49 pudiera ser regulado por DRBD3 en *T. cruzi* mediante la unión a su dominio rico en AU.

Gene	Organism	Product
Tb427.04.1910	Trypanosoma brucei Lister strain 427	hypothetical protein, conserved
Tb927.4.1910	Trypanosoma brucei TREU927	hypothetical protein, conserved
Tbg972.4.1830	Trypanosoma brucei gambiense DAL972	hypothetical protein, conserved
TcIL3000_4_1610	Trypanosoma congolense IL3000	hypothetical protein, conserved
TcCLB.503923.40	Trypanosoma cruzi CL Brener Non-Esmeraldo-like	hypothetical protein, conserved
TCSYLVIO_003833	Trypanosoma cruzi Sylvio X10/1	hypothetical protein
Tc_MARK_2556	Trypanosoma cruzi marinkellei strain B7	hypothetical protein, conserved
TevSTIB805.4.1980	Trypanosoma evansi strain STIB 805	hypothetical protein, conserved
Tgr.225.1110	Trypanosoma grayi ANR4	hypothetical conserved protein
TvY486_0401690	Trypanosoma vivax Y486	hypothetical protein, conserved

Tabla 1. Ortólogos de Tc49 de *T. cruzi* en tripanosomatidos. Búsqueda de ortólogos de Tc49 en la base de datos *TriTrypDB*. (http://tritrypdb.org/tritrypdb/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source_id=TcCLB.510877.190&project_id=TriTrypDB)

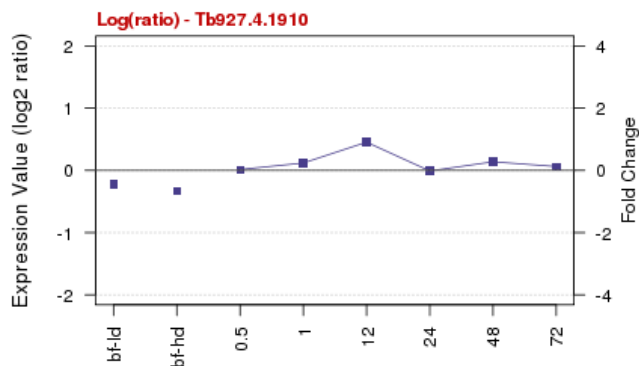


Figura 8. Perfil de expresión de Tb927.4.1910 durante la diferenciación *in vitro* de *T. brucei*. Figura obtenida de la base de datos *TriTrypDB*. bf-ld.- forma sanguínea larga, bf-hd.- forma sanguínea corta, 0.5, 1, 12, 24, 48 y 72 horas post-inducción de la diferenciación con *cis*-aconitato.

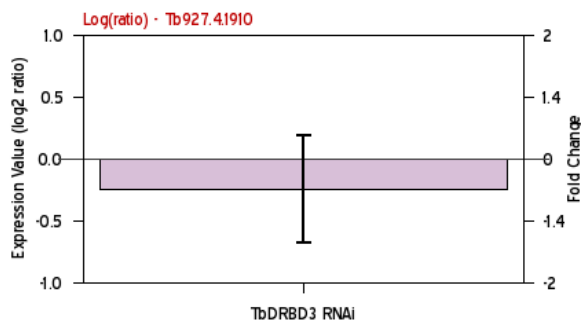


Figura 9. Perfil de expresión del gen Tb927.4.1910 en formas procíclicas de *T. brucei* deficientes de TBDRD3. Análisis de expresión obtenido de la base de datos de *TriTrypDB*.

```

ATGTTGTCTCTGGACTCGTACGTCTACCCGAGGGGCGGTGCCGCTGCTTCTCTTCTCCCACTCATGGATTGTACGAGCGCTATC
CACAACCTCGGACAATATTCAAAACGGTGCGCCCAATTTCAACAACGGTAAAGAGCGTCAACGCTGTAGCATCGGCGGGAATTGTGAAG
GAAACGACATATGCCACGTCAGAACCCAGAGATTTGCTTCCCGATAAAACATACCAATAAACCCTGACACGGCTACATCGGCGGAC
GGTTCTCCCTGCGTCCCAACGCTCTCCCTTTCCGCGGAGGTGAGATTTCTGATGTCGTACAAGGACGAAAGCAGAAAGGCTCAAT
ACGTTGATGTCGACATCCAACGAGCCACGCGATGATGGCAACGGTGGCGAAAAACAGCTGCAGTGCCTTTCAGGGTCTATGAAGAAG
GGTGTTCCTCCACCTGCTCCTCGAAGCAGCACAATCAAACAATCCGCTTATCGCTCCCACTTCGTCAGGGTCTGCTGCTGCTGCT
GCTACTGCTCCTACAACACCACTGTTATGAGACCAATCCCATCAGCAGGGAGTCGACATTGTCGTCAACCCACGCCACAGCAAGG
CGTCTGGAGATTCGAAATACCCGTACCAATGCTTTGCACCAATCACTCACAATAAATCTGGTTCTTCTGCGGCAGCAGCGACA
ACGACAACATCTACTTCAGTAACGCATGTCCGGTGAAGCGCGTATACGTGAACGGACGTCATGACTGTGTGGCTTAATGGTAAC
GAACATTCATAAAGGGAAGGGATAAGTGAACGGGGCGGCTACGAAACATTTTTTTTTTTTTTTCTTCTATTCCCTGGCGGTTGTGAA
TTCAATAAAATAAAATAAAATAAAATAGAAATGAACATAAAAAAAAAAAAAAAAAACAGAAAGGAGTGATAGAAACGGAATGTGGA
TGAGTGGACGCTGCATTATTTATTTATTTATTTATTTATTTAGTTGTTGTTGTTCTTTTTATTGGGTGTTTTTTTTTTTTTCTATTTCTTT
TTGATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

```

Figura 10. Análisis *in silico* de la región UTR-3' de Tc49 de *T. cruzi*. Esquema de la secuencia codificante (azul) y de la región UTR-3' de Tc49 (negro), donde se muestra un dominio rico en AU (rojo).

3. Justificación

Aun cuando el proceso de diferenciación de *T. cruzi* es determinante para que el parásito complete su ciclo de vida, sobreviva y establezca la patogénesis de la enfermedad de Chagas, es poco lo que se conoce de las proteínas participantes y de los mecanismos moleculares involucrados, por lo que es necesario la identificación y caracterización de moléculas que participen en este proceso.

4. Hipótesis

Tc49, se expresa diferencialmente en una FI de la amastigogénesis secundaria de *T. cruzi* y participa en el proceso de diferenciación del parásito.

5. Objetivo General

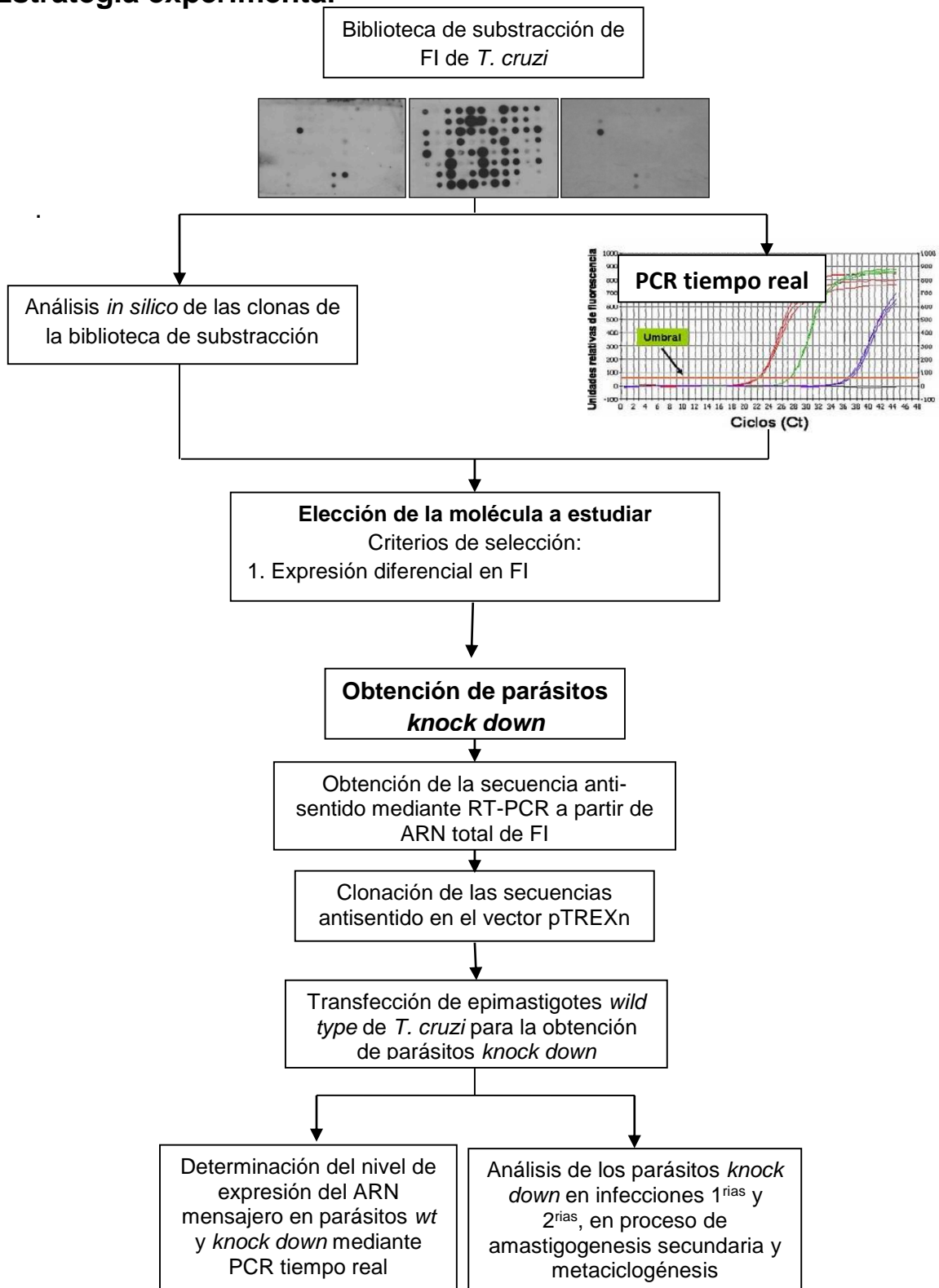
Corroborar la expresión diferencial de las clonas de la biblioteca de substracción por una técnica cuantitativa (RT-PCR tiempo real) y caracterizar biológica y molecularmente a la clona Tc49 de *T. cruzi*.

6. Objetivos Particulares

- 6.1. Corroborar la expresión diferencial de las clonas de la biblioteca de substracción de FI por una técnica cuantitativa (RT-PCR tiempo real).
- 6.2. Evaluar los niveles de expresión de ARN mensajero de Tc49 en los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi*, mediante RT-PCR tiempo real.
- 6.3. Evaluar la participación de Tc49 en el proceso de diferenciación de *T. cruzi*.
 - 6.3.1. Obtener parásitos *knock down* mediante ARN antisentido.

- 6.3.2. Evaluar la expresión del ARN antisentido y disminución del ARN mensajero de Tc49 mediante RT-PCR tiempo real.
- 6.3.3. Evaluar la capacidad de crecimiento de los parásitos *knock down* y controles.
- 6.3.4. Evaluar la capacidad de diferenciación de los parásitos *knock down*.
 - 6.3.4.1. En infecciones en fibroblastos 3T3.
 - a. Transformación extracelular
 - b. Infección
 - 6.3.4.2. *In vitro* en amastigogenesis 2ria.
 - 6.3.4.3. *In vitro* en Metaciclogénesis.

7. Estrategia experimental



8. Materiales y métodos

8.1. Análisis *in silico*

Utilizando la base de datos *TriTrypDB*, se buscó la secuencia nucleotídica y de aminoácidos de cada una de las secuencias de la biblioteca de substracción de FI. Posteriormente, mediante los programas SMART, Pfam, Prosite y My hits se buscó las familias, dominios y sitios funcionales de proteínas. Con el programa Softberry se buscó la posible localización sub-celular de la proteína. Mediante SOSUI se buscó posibles regiones transmembrana de la proteína. Utilizando SignalP la predicción de péptido señal y la localización de los sitios de corte del péptido señal. Mediante DictyOGlyc se buscó posibles sitios de o-glicosilación y con NetNES la predicción de posibles señales de exportación nuclear ricos en leucina.

8.2. Línea celular

Se utilizó la línea celular de fibroblastos de embrión de ratón 3T3 NIH (ATCC Numero CRL -1658TM), los cuales se cultivaron en cajas *corning* de 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*) complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS por sus siglas en ingles "*fetal bovine serum*"), 1 % de glutamina y 5 mg/ml de penicilina-estreptomina (10,000 U/ μ l/ml en solución salina de NaCl al 0.85%) e incubados a 37°C en una atmosfera húmeda en presencia de CO₂ al 5% hasta una confluencia del 70%. Para su resiembra, la monocapa de células se lavó con 3 ml de PBS 1X EDTA 0.53 M, posteriormente se adicionó 1 ml de tripsina-EDTA y se dejó a 37° C durante 5 minutos. La caja se agitó ligeramente para desprender las células, se tomaron 100 μ l de la suspensión celular y se colocaron en una caja con 10 ml de medio DMEM nuevo para mantener el stock.

8.3. Infecciones primarias

Se infectaron monocapas de fibroblastos 3T3 NIH a una confluencia del 70%, en frascos *Corning* de 225 cm² para cultivo celular como se ha descrito previamente por Manning-Cela R y cols., 2001. Para la infección se utilizaron 9x10⁷ epimastigotes WT cepa CL-Brener en fase logarítmica de crecimiento. Las células infectadas se incubaron a 37° C en presencia de 5% de CO₂ con medio DMEM complementado con 2% de FBS, 1% de glutamina y 5 mg/ml de penicilina-estreptomicina. A partir de las 48 horas post infección se cambió el medio DMEM complementado con 2% de FBS diariamente y se monitoreo el progreso de la infección. Cabe mencionar que en el caso de la cepa CL Brener es posible iniciar las infecciones con epimastigotes, debido a que bajo las condiciones usadas éstos se transforman eficientemente a los estadios infectivos de tripomastigotes y amastigotes dando lugar a infecciones productivas.

Para la evaluar las etapas que ocurren durante la infección intracelular de fibroblastos 3T3 NIH (entrada, diferenciación de tripomastigote hacia amastigote, multiplicación de amastigote y diferenciación de amastigote hacia tripomastigote) se realizaron infecciones primarias siguiendo el protocolo descrito anteriormente, pero hechas en cubre-objetos de 13 mm dentro de cajas *Corning* de 65 cm² infectadas con 1X10⁷ epimastigotes *knock down* y controles. Transcurrido el tiempo a evaluar (48 horas, 6, 8, 10, 12 y 14 días post-infección) se tomó un cubre-objeto y fue lavado con PBS 1X, posteriormente se permeabilizó con acetona fría (-20°C) durante cinco minutos, finalizado este tiempo, la monocapa de fibroblastos se lavó con PBS 1X frío y finalmente se tiñó el núcleo de los parásitos intracelulares así como el núcleo de las células con 100 µL de una dilución 1:1000 de DAPI (5 mg/mL) durante cinco minutos, se lavó con PBS 1X frío y los cubreobjetos se colocaron sobre una gota de airvol encima de un portaobjetos. Cada una de las tinciones fue evaluada en un microscopio de epifluorescencia *Olympus* modelo BX41TF.

8.4. Parásitos

8.4.1. Epimastigotes

Se utilizaron epimastigotes *wild type* (WT) de la cepa CL-Brener de *T. cruzi* aislada del vector *Triatoma infestans* (Brener and Chiari, 1963). Los cultivos de epimastigotes WT se mantuvieron en tubos falcón de 15 ml a una razón de 1:10 con medio LIT (*Liver infusión-tryptose*) suplementado con 10% de FBS, 0.5% de ampicilina-estreptomicina y 0.1 mg/ml de hemina, a 28 °C.

8.4.2. Tripomastigotes y amastigotes

Los tripomastigotes y amastigotes se obtuvieron del sobrenadante de la monocapa de fibroblastos 3T3 infectados a partir de los 8 días post infección, los cuales se evaluaron en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio de luz para determinar el porcentaje de tripomastigotes y amastigotes. Para la purificación, se obtuvo el sobrenadante y se centrifugó a 6000 rpm 5 min para obtener la pastilla de parásitos. Posteriormente la pastilla se re-suspendió en el medio del hibridoma que produce el anticuerpo 2C2B6, que reconoce el antígeno de superficie Ssp-4, específico de amastigotes (Andrews NW y cols., 1987). Se utilizaron de 300-500 µl de anticuerpo por cada 3×10^8 parásitos, se incubaron de 30-60 min a 37° C hasta obtener agregados de amastigotes. Los parásitos se centrifugaron a 800 rpm durante 10 seg en repetidas ocasiones, hasta obtener en el sobrenadante el mayor porcentaje de tripomastigotes purificados y en la pastilla los amastigotes (Hernández-Osorio LA y cols., 2010).

8.4.3. Formas intermedias (FIs)

Solo los tripomastigotes liberados a tiempos tempranos de la infección (6-8 día post infección) fueron usados en los experimentos de diferenciación de tripomastigotes a FIs. Una vez purificados los tripomastigotes se centrifugaron a 3000 rpm/10 min y se re-suspendieron en medio DMEM alta glucosa a pH=5 sin complementar a una densidad de 5×10^6 parásitos/ml en cajas de cultivo de 100 X

20 mm *corning*, se incubaron a una temperatura de 37° C con 5% de CO₂. Mediante microscopia de luz se monitoreó cada hora para verificar su transformación correspondiente hasta las 3 horas de inducción (Hernández-Osorio LA y cols., 2010).

8.5. Metaciclologénesis *in vitro*

Se utilizaron epimastigotes WT de la cepa CL-Brener de *T. cruzi*. Los cultivos de epimastigotes WT se mantuvieron en tubos falcón de 15 ml a una razón de 1:10 con medio LIT suplementado con 10% de FBS, 0.5% de ampicilina-estreptomicina y 0.1 mg/ml de hemina, a 28 °C durante 7 días. Para el ensayo de metaciclologénesis, se utilizaron 5 x 10⁸ epimastigotes/ml y se lavaron con PBS 1X, se incubaron en medio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 8 mM Buffer de fosfatos pH 6.0) a 28 °C durante 2 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se tomaron 5 x 10⁶ epimastigotes/ml y se lavaron con PBS 1X, se incubaron en medio TAU3AAG (medio TAU suplementado con 10 mM de glucosa, 2 mM de ácido L-aspártico, 50 mM de ácido L-glutámico, 10 mM de L-prolina y 2 % de FBS) en cajas tratadas (para la adhesión de los epimastigotes a la superficie) durante un tiempo de 72 horas a una temperatura de 28 °C. Finalmente, se cuantificaron las formas de epimastigote y tripomastigote metacíclico utilizando un microscopio óptico.

8.6. Extracción de ARN total

El ARN total de epimastigotes, tripomastigotes, amastigotes y FIs de *T. cruzi* fue extraído utilizando el método de Trizol (Gibco) de acuerdo a las especificaciones del proveedor, con las siguientes modificaciones. Los parásitos se centrifugaron a 3,000 rpm durante 6 min para obtener la pastilla, la cual se re-suspendió en 2-4 volúmenes de trizol. Posteriormente, se adicionó 1 volumen de cloroformo y se mezcló en vortex por 15 seg, se dejó a temperatura ambiente durante 3 min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml, se adicionó 1.5 volúmenes de isopropanol frío y se dejó 10 min a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C para obtener la pastilla de ARN y se lavó con etanol al 75% por

centrifugación a 7,500 rpm durante 5 min a 4 °C. Después de secar parcialmente la pastilla a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min, la muestra se re-suspendió en H₂O-DEPC (dietilpirocarbonato) y se cuantificó en un espectrofotómetro (Eppendorf Bio) a una longitud de onda de 260 nm.

8.7. Ensayo de transcripción reversa (RT)

Se utilizó el kit “*SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR*” (Cat. No. 18080-051, de *Invitrogen*) de acuerdo a las especificaciones del proveedor con las siguientes modificaciones. El ARN mensajero de epimastigotes, tripomastigotes, amastigotes y FI’s fue usado como cadena molde para la obtención del ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa, utilizando como iniciador el oligonucleótido RDEdT (5’GCG GCG GAT CCT TTT TTT TTT TTT TTT TT 3’). Posteriormente, se realizó la digestión del ARN con *ARNasa H* y la subsecuente inactivación de la enzima sometiénola a 70° C durante 15 min.

8.8. Ensayo de PCR

Para amplificar el ADNc de doble cadena a partir de ADNc de cadena sencilla de epimastigotes, tripomastigotes, amastigotes y FI’s se utilizó la enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Cat. No. 11304-011, de *Invitrogen*). Para realizar estas reacciones se utilizó como templado el ADNc obtenido en el ensayo de RT, como oligonucleótido sentido a RDEME (5’ GCG GCG GAT CCA **CAG TTT CTG TAC TAT ATT G** 3’) el cual contiene la secuencia de Mini-Exón (en negritas) presente en el extremo 5’ de todos los ARNm de *T. cruzi*, y como oligonucleótido antisentido a RDEdT complementario a la cola de poli A.

8.9. Ensayo de PCR en tiempo real

Para la reacción de PCR tiempo real se utilizó el kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Cat. No. 4367659, Applied Biosystems) de acuerdo a las especificaciones del proveedor con las siguientes modificaciones. Como molde se usó ADNc de doble cadena de epimastigotes, tripomastigotes, amastigotes y FI’s y

los oligonucleótidos sentido y antisentido para cada una de las clonas a analizar (**Tabla 2**). Los oligonucleótidos se diseñaron tomando en cuenta las siguientes recomendaciones: Se recomiendan amplicones entre 50-150 pb, el tamaño de oligonucleótidos debe ser entre 18-30 nucleótidos, Tm: 58-60°C, contenido de GC: 30-80 %, evitar complementariedad interna y entre los oligonucleótidos especialmente en extremos 3' para evitar los dímeros de oligonucleótidos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador modelo *Step one* de *Applied Biosystems*.

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos para PCR tiempo real

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Longitud
C3S	GCGGACGTTTGTGGTCGTCG	20
C3AS	GGGCCGACGGGATGGCAAG	19
C7S	CGTCTCACTCGCGCCTCGAAG	21
C7AS	GGATGCCAAACGTCCGCACC	20
C9S	CGTCCCACACCCAGCGACC	19
C9AS	GCACGACAATCCAGCCGAAAG	22
C11S	CCGCAGGTAAGGGGTCAAAGTC	22
C11AS	GGGAGCATAGAGCGAATCTACTG	23
C16S	GCAAGCAGTTCATCGTGGAGGTG	23
C16AS	CGGCGAAACTGTAGAGCGACG	22
C22S	GAGGGAGTGCCAACTCGCATTTG	23
C22AS	CCCAATGCCGCTGTTCGTCC	20
C24S	CTGAACATGCCGCCGGGTTTC	21
C24AS	CCATCAGAGCATCGTTGCAACCATC	25
C26S	CAGGGCACAGGACCGCATCAC	21
C26AS	CTTCGTGAGTGTGCCCCGCTTC	22

C29S	CTGCTCCTCCTCGTCGTGATGATG	24
C29AS	GATCGACTCCCTGCGGCAATTGC	23
C35S	CATGTTGCCCGTGTCACTGCAGATC	25
C35AS	GCCGATCCCACCTGACGCTC	20
C41S	CGGGCAGCATCACTCTTGGAC	21
C41AS	CTCTTCCGATCGTCGCCCAATC	22
C49S	GAGCGCTATCCACAACCTCGGAC	22
C49AS	GTCGTTTCCTTCACAATTCCCGCC	24
C52S	GTGAAGCATGTCCCTCGAGTCTTAC	25
C52AS	CACGCTGGACCAAGGGCATAG	21
C53S	CGACTTTACGCGCTACACGACAAC	24
C53AS	CTGCTGCTTCCACCGCTTGTC	21
C59S	GAAGGCGCCCCGCACACACAAC	22
C59AS	CATGTTGGGCCTCTGCAAGCTC	22
C80S	GCACCTCCCGCTCCTGTGATTAAAC	25
C80AS	GCAAAGTCGTGAGCACCGAAAAC	24

8.10. Obtención de parásitos *knock down* mediante la técnica de ARN antisentido.

8.10.1. Obtención de la secuencia anti-sentido

La secuencia antisentido se obtuvo mediante PCR, utilizando como molde ADNc de la FI de *T. cruzi*. Con los oligonucleótidos RNAAs 811318.1 S (CCG **CTC GAG** ATG TTG TCT CTG GAC TCG TAC G) con sitio de restricción para *XhoI* en negritas y RNAAs 811318.1 As (CCC **AAG CTT** CCA TGA GTG GGG GAA GAA AAG G) con sitio de restricción para *HindIII*, diseñados y dirigidos contra los primeros 70 pb del gen de Tc49 de *T. cruzi* (Numero de acceso XM_811318.1).

8.10.2. Clonación de la secuencia en orientación antisentido en el vector pTREXn

El producto de amplificación (70 pb) obtenido para Tc49 se purificó mediante columna como lo describe el proveedor (QIAGEN) y posteriormente se digirió con las enzimas *XhoI* y *HindIII* al igual que el ADN del vector pTREXn, para obtener extremos cohesivos que faciliten la ligación del inserto de Tc49 y el vector pTREXn linearizado. La reacción de ligación se realizó a una relación 1:5 inserto-vector, y se incubó durante 16 horas o durante toda la noche a 4° C. Terminada la reacción de ligación, con el producto pTREXn-Tc49 antisentido se transformaron bacterias *E. coli* DH5α calcio competentes y se plaquearon en cajas Petri con LB-agar y ampicilina (100 µg/ml). El análisis de clonas se realizó mediante PCR de colonia con los oligonucleótidos RNAAs 811318.1 S y RNAAs 811318.1 As y mediante la extracción del ADN de plásmido de colonias blancas y su posterior análisis de restricción con las enzimas *XhoI* y *HindIII*.

8.10.3. Transfección de Epimastigotes *wild type* de *T. cruzi* por electroporación con la construcción pTREXn-Tc49 antisentido.

Para la transfección con el plásmido pTREXn-Tc49 antisentido fueron utilizados 3×10^8 epimastigotes de *T. cruzi*. Los epimastigotes se lavaron en 10 ml de medio LIT no complementado pre-enfriado centrifugando a 800 g, durante 10

min. Posteriormente los parásitos se re-suspendieron en 350 µl de medio LIT sin complementar, y se colocaron en cubetas de electroporación (BTX 2 mm) pre-friadas. Se adicionaron 40 µl de ADN (100 µg) del plásmido purificado mediante cloruro de cesio. Los parásitos se transfectaron en un electroporador BTX ECM 830 con una descarga eléctrica de 300 V de 12 ms y se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se re-suspendieron en 10 ml de medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) complementado con 10% FBS (GIBCO No. Cat. 12318-028) 0.5% de penicilina/estreptomicina (GIBCO No. Cat. 15140-122) y 1% de hemina (5 mg/ml) e incubados a 28 °C durante 48 h. Posteriormente el cultivo se llevó a una dilución 1:5 en medio LIT conteniendo 500 µg/ml de Geneticina (G418) para la selección de los parásitos estables.

8.11. Transformación bacteriana mediante choque térmico

La transformación de bacterias *E. coli* DH5α y BL21 origami con los plásmidos obtenidos en este trabajo, se realizó mediante choque térmico colocando en un tubo de vidrio frío con tapa, el ADN de plásmido o en su caso la reacción de ligación. Se adicionaron 50 µl de células calcio-competentes DH5α o BL21 según fue el caso. Posteriormente se les aplicó un choque térmico a 42 °C durante 1:30 minutos exactos e inmediatamente se incubaron en hielo durante 2 min y después a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregó 1 ml de LB (Luria-Bertani para 1 litro: triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g) y se incubó a 30 °C o 37 °C en agitación durante 1:30 horas. Terminada la incubación se tomaron 300 µl y se distribuyeron sobre una caja petri con LB-agar y ampicilina (100 µg/ml). Posteriormente la caja plaqueada se incubó a 30 °C o 37 °C durante 16 horas o toda la noche (Sambrook J y Rusell D, 2001).

8.12. Extracción de ADN

8.12.1. Método STET o lisis por ebullición (para ADN de plásmido).

Se partió de cultivos de 5 ml de LB-ampicilina (100 µg/ml), inoculados con una colonia bacteriana resistente al antibiótico de selección e incubados toda la noche a 30° C en agitación a 2,500 rpm en un aparato *Environ Shaker*. Para obtener

la pastilla los cultivos se centrifugaron a 8,500 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió con 350 µl de solución STET (Tris-Cl 10 mM pH 8, NaCl 0.1 M, EDTA 1mM pH 8, Tritón X-100 5%). Se adicionaron 25 µl de lisozima (10 mg/ml) preparada en el momento y las muestras se hirvieron en baño maría durante 40 seg exactamente. Las muestras se dejaron reposar durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 2.5 M y 2.5 volúmenes de isopropanol durante 5 min a temperatura ambiente. El ADN se recuperó por centrifugación a 12,000 rpm durante 5 min a 4° C, después de centrifugar se desechó el sobrenadante y las pastillas se lavaron dos veces con etanol al 70% centrifugando a 12,000 rpm durante 5 min a 4° C. Las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se re-suspendieron en 30-50 µl de TE (10 mM Tris-Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) (Sambrook J y Rusell D, 2001).

8.12.2. Método de lisis alcalina (para ADN de plásmido).

Se partió de cultivos de 10 ml LB-ampicilina inoculados con una colonia bacteriana resistente al antibiótico de selección e incubando toda la noche a 30 °C en agitación a 2,500 rpm en un aparato *Environ Shaker*. Los cultivos se centrifugaron a 8,500 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 200 µl de la solución de lisis I (Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM ph 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0). Después de mezclar muy bien, se adicionaron 400 µl de la solución de lisis II (0.2 N NaOH, 1% SDS) preparada al momento, el tubo se mezcló suavemente de 3-5 veces y se dejó en hielo 5 min. Se agregaron 300 µl de la solución III (Acetato glacial 5 M, acetato potásico 5 M), se dejó en hielo 5 min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se incubó con ARNsa (10 µg/ml) a 37 °C durante 1-2 horas. Se agregó un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1) y se mezcló fuertemente hasta obtener una emulsión. La emulsión se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa. El ADN se precipitó adicionando un volumen igual de isopropanol dejando 10 min a temperatura ambiente y centrifugando a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Después se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos

veces con 1 ml de etanol al 70% centrifugando a 12,000 rpm durante 5 min a 4° C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente el ADN se re-suspendió en 50 µl de TE (Sambrook J y Rusell D, 2001).

8.12.3. Extracción de ADN por cloruro de cesio (CICs).

Este procedimiento se utiliza para extraer gran cantidad de ADN con un alto grado de pureza, además de permitir la separación del ADN circular del ADN cortado de una sola cadena. Primeramente se inoculó una colonia positiva en 20 ml de LB (Luria-Bertoni) conteniendo ampicilina (100 µg/ml), se incubó a 30 °C durante 8 h en agitación. Después se tomaron 5 ml de este cultivo y se colocaron en un matraz de 1 litro con 500 µl de medio LB (Luria-Bertoni) conteniendo ampicilina (100 µg/ml). El cultivo se incubó toda la noche a 30 °C en agitación, y se centrifugó a 10,500 g durante 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se re-suspendió en 4 ml de solución TS (Tris-Cl 50 mM, sucrosa al 25%, ajustada a 500 ml), luego se agregó 4 ml de solución ELT (EDTA 100 mM, lisozima 2 mg/ml, Tritón X-100 0.1% ajustada a 200 ml) y se incubó a 70 °C por 10 min exactos. Después se ultracentrifugó a 40,000 rpm en un rotor *SW 40Ti* durante 20 min a 4 °C, posteriormente se recuperó el sobrenadante en un tubo *Corex* de 30 ml #8445 y se agregó un volumen igual de solución PEG-NaCl, se mezcló por inmersión y se incubó 30 min a temperatura ambiente. La muestra se ultracentrifugó a 70,000 rpm por 10 min a 4 °C en un rotor *SS*, se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida se re-suspendió en 3 ml de TE (10 mM Tris-Cl ph8.0, 1 mM EDTA ph8.0). La muestra obtenida se trató con 25 µl de ARNasa (5 µg/ml) incubando a 37 °C por 4 h. A continuación se adicionaron 4 g de CICs y 500 µl de bromuro de etidio (5 mg/ml), esta mezcla se ultracentrifugó a 90,000 rpm por 4 h a 20 °C en un rotor *NVT90*. En este paso con ayuda de luz UV se observó la banda formada por el ADN circular y esta se recuperó con una jeringa y aguja colocando el ADN en tubos *Falcon* y se lavó con un volumen de butanol saturado centrifugando a 10,500 g durante 1 min, el lavado se repitió cuantas veces fue necesario hasta eliminar el bromuro de etidio. Luego se agregaron 3 volúmenes de etanol al 70% y se dejó a -20 °C toda la noche.

La muestra se centrifugó a 10,500 g durante 30 min a 4 °C y la pastilla obtenida se re-suspendió en 200 µl de TE (10 mM Tris-Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0). Posteriormente se realizó la extracción del ADN con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), mezclando en vortex y centrifugando a 11,200 g durante 1 min. Se recuperó la fase acuosa y se agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio 2.5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, incubando la mezcla a -70 °C por 20 min. Finalmente la mezcla precipitada se centrifugo 11,200 g por 10 min a 4 °C y se lavó con etanol al 70% por centrifugación a 11,200 g por 10 min a 4 °C. La pastilla obtenida se dejó secar a temperatura ambiente y se re-suspendió en 50 µl de TE estéril (10 mM Tris-Cl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0).

8.13. Análisis de ADN por electroforesis

El análisis de ADN se realizó mediante electroforesis utilizando geles de agarosa al 1% con TBE 0.5X (0.045 M Tris-Borato, 1mM EDTA pH 8.0), los cuales se corrieron en cámaras para electroforesis utilizando como *buffer* de corrida TBE 0.5X. Las muestras de ADN se prepararon con *buffer* de muestra (azul de bromofenol 0.25%, glicerol 30% y xilencianol 0.25%). Las condiciones de corrida fueron 100 V durante 40 min. Terminada la electroforesis el gel se tiño con bromuro de etidio y la imagen fue capturada con una cámara digital *Kodak EDAS 290*, utilizando un transluminador de luz UV (Sambrook J y Rusell D, 2001).

9. Resultados

9.1. Corroboración de la expresión diferencial de las clonas de la biblioteca de substracción de FI por una técnica cuantitativa (RT-PCR tiempo real)

9.1.1. Obtención de ADNc de tripomastigote y FI de *T. cruzi*.

Como se dijo anteriormente en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Sánchez-Cruz DG, 2009, Tesis de Maestría), se obtuvo una biblioteca de substracción, de una FI obtenida durante una amastigogénesis secundaria *in vitro*, con respecto a tripomastigotes de *T. cruzi*. El análisis inicial de la biblioteca, fue realizado por ensayos de *dot blot* en donde se hibridaron tres membranas idénticas conteniendo el ADN de cada una de las clonas, con ADNc marcado radioactivamente de tripomastigotes, FI y amastigotes. Ya que el ensayo anterior es semi-cuantitativo, era necesario realizar la corroboración de la expresión diferencial de las clonas candidatas utilizando una técnica cuantitativa y más sensible a la previamente utilizada. Por lo tanto en este trabajo se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR tiempo real, usando ADNc de tripomastigotes y FI de *T. cruzi* para realizar la validación de la biblioteca de substracción obtenida.

Para ello se obtuvo ARN total tanto de tripomastigote como de FI, el cual fue tratado con ADNasa para asegurarnos que después de la reacción de retro-transcripción y amplificación por PCR, el producto no proviniera de ADN contaminante. Como control, se colocaron dos reacciones adicionales, una utilizando ARN total sin tratar con ADNasa y otra en donde el ARN total no fue tratado con retro-transcriptasa. Como se muestra en la **Figura 11A**, tanto el ARN total de tripomastigotes como de FI, mostraron las bandas características de ARN ribosomal de 24S α y β , así como la de 18S. Este resultado indicó que las muestras de ARN total a utilizar para las siguientes reacciones se encontraban en condiciones integrales y que el tratamiento con ADNasa no degrada la muestra de ARN. Posteriormente, se realizó la obtención de ADNc utilizando únicamente ARN total tratado con ADNasa, y como control la misma reacción pero sin retro-transcriptasa. Se obtuvieron los ADNc correspondientes, utilizando un oligonucleótido dT y la

retro-transcriptasa. El producto se amplificó por PCR usando el mismo oligonucleótido dT más el oligonucleótido RDEME que está dirigido al extremo 5' de la secuencia del Mini-exón. Como se muestra en la **Figura 11B**, se obtuvo un producto que corre en forma de barrido en un gel de agarosa en el caso donde se agregó la retro-transcriptasa y no así cuando no se agregó la enzima. Este resultado indicó que el producto de amplificación proviene del ADNc y no de contaminación de ADN en la muestra. Por ultimo para la confirmación de la obtención de ADNc y verificar su integridad, se realizó una reacción de PCR de una secuencia conocida. Se obtuvo el producto de amplificación de 1382 pb correspondiente al peso molecular esperado de tripanina, confirmando así la obtención e integridad del ADNc de ambos estadios del parásito (**Figura 11C**).

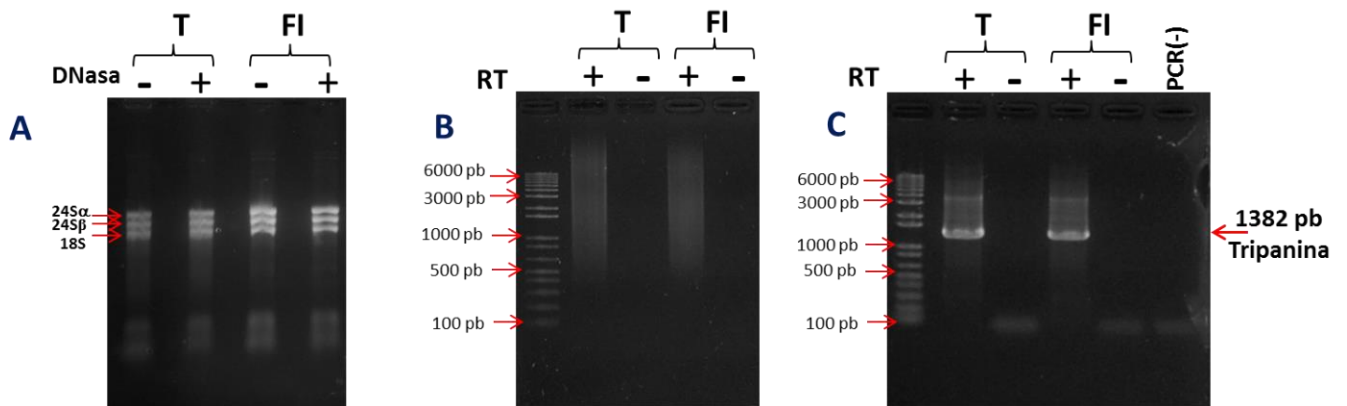


Figura 11. Obtención de ADNc de FI y de tripomastigote de *T. cruzi*. A. Obtención de ARN total de T y FI. B.- ADNc de T y FI. C.- PCR de tripanina.

9.1.2. Estandarización de la concentración óptima de templado y condiciones de reacción, de las clonas de la biblioteca de substracción de FI y controles.

Para evaluar la expresión diferencial de los transcritos de FI con respecto a tripomastigotes, por los ensayos de PCR tiempo real, era necesario primero estandarizar las condiciones de reacción para cada una de las secuencias a estudiar. Para ello, una vez obtenido el ADNc de FI se estandarizaron las concentraciones óptimas de ADNc y condiciones de reacción. Se realizaron curvas estándar de concentración de ADNc mediante diluciones seriadas 1:10, que permitieron determinar el rango dinámico de concentración (máximo- mínimo), la eficiencia de amplificación y la concentración de ADNc a utilizar en los ensayos finales de PCR tiempo real. Para todos los casos se utilizaron desde 0.001 ng hasta 1 µg de ADNc de FI (0.001 ng, 0.01 ng, 0.1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng y 1 µg).

En la **Figura 12** se muestra un ejemplo representativo de una de las 17 secuencias analizadas (**Figura 12A**). Este ejemplo corresponde a la secuencia de C53, en donde se muestran las curvas de amplificación logarítmica típicas obtenidas en ensayos de PCR tiempo real, cuyo rango dinámico o de concentración óptima fue de 0.1 ng hasta 100 ng (**Figura 12A, panel A.1 hasta A.4**). Para las otras concentraciones probadas (0.001 ng, 0.01 ng y 1 ng) se obtuvo amplificación pero fuera del rango dinámico (datos no mostrados) indicando que estas concentraciones de ADNc no son óptimas. Por lo tanto para los ensayos finales de C53 utilizamos 1 ng de ADNc, que era una de las concentración intermedias de las concentraciones optimas (0.1 ng, 1 ng, 10 ng y 100 ng). Como control de reacción se realizó la misma mezcla pero sin contener ADNc, en donde como era esperado no se obtuvo amplificación indicando la especificidad del ensayo (**Figura 12A, panel A.5**).

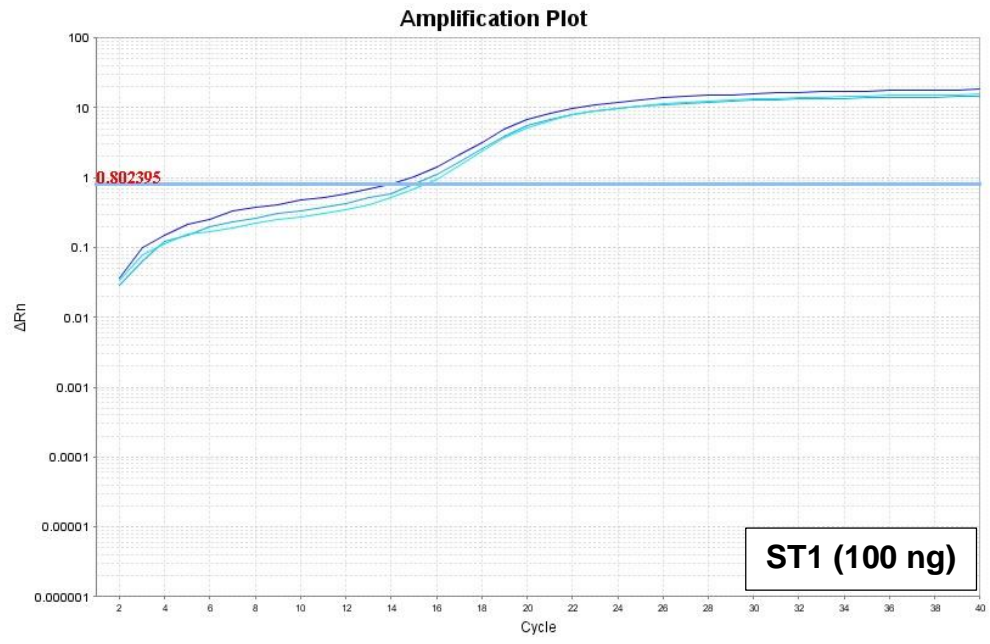
Para determinar la eficiencia de amplificación y llevar a cabo la normalización de los resultados, se utilizó una secuencia endógena con expresión constitutiva, que en este caso correspondió a GAPDH. Como se muestra en la **Figura 12B**, GAPDH mostró una concentración optima de 0.1 ng hasta 100 ng (**Figura 12B, panel B.1 hasta B.4**). Para las otras concentraciones probadas (0.001 ng, 0.01 ng y 1 ng) se

obtuvo amplificación pero fuera del rango dinámico (Datos no mostrados) indicando que estas concentraciones de ADNc no son óptimas. Al igual que en la muestra se corrió un control de reacción conteniendo la misma mezcla pero sin ADNc, en donde como era esperado no se obtuvo amplificación indicando la especificidad del ensayo (**Figura 12B, panel B.5**).

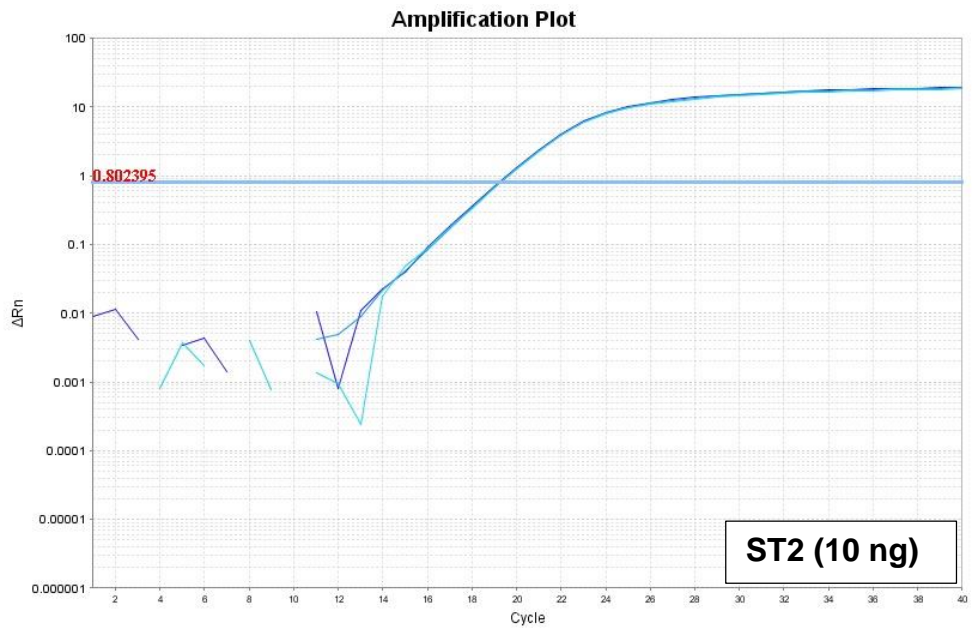
Cuando se analizaron las 17 secuencias en estudio, se encontró que la mayoría de éstas tenían un rango dinámico óptimo entre 0.1 ng y 100 ng o entre 0.1 ng y 10 ng. Por lo tanto, al igual que en C53 se eligió la concentración intermedia del rango óptimo para usar en los ensayos finales (**Tabla 3**).

Para cada muestra fue necesario correr de manera simultánea su propio control de GAPDH y determinar el rango dinámico de concentración de ADNc para ambos casos (**Tabla 3**). Además para poder llevar a cabo la normalización de los resultados era necesario que la concentración óptima tanto de la muestra como del control fuera la misma. Por lo tanto, como se muestra en la **Tabla 3**, en todos los casos tanto en la muestra como en su control de GAPDH se utilizó la misma concentración de ADNc para los ensayos finales.

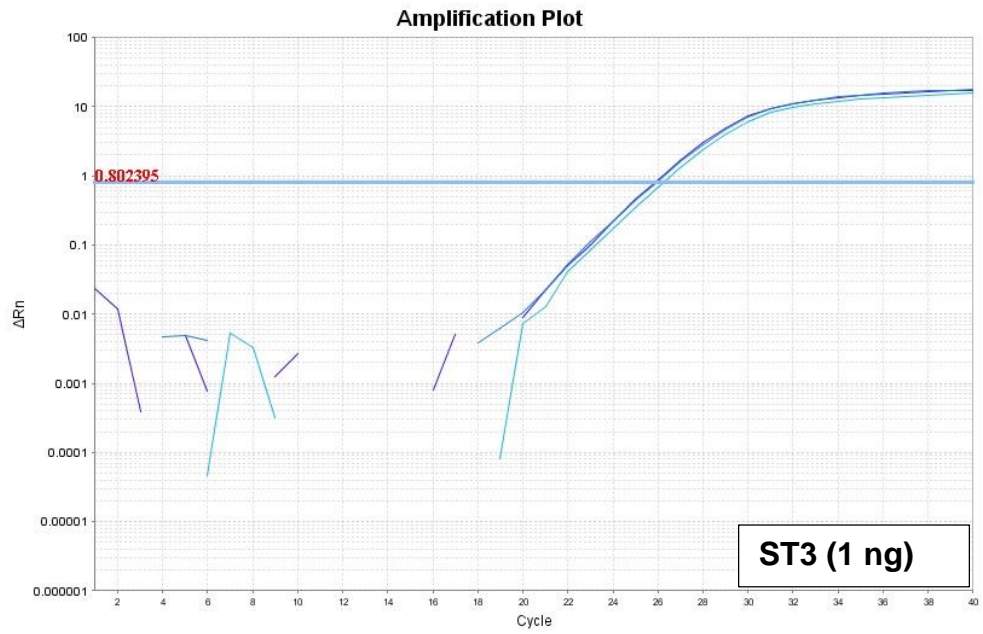
A.1



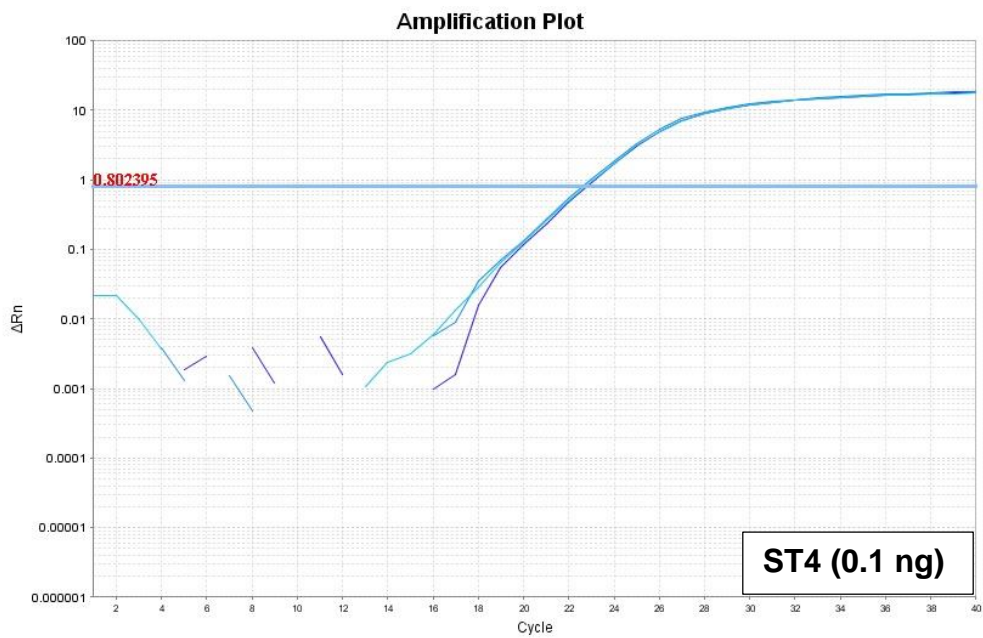
A.2



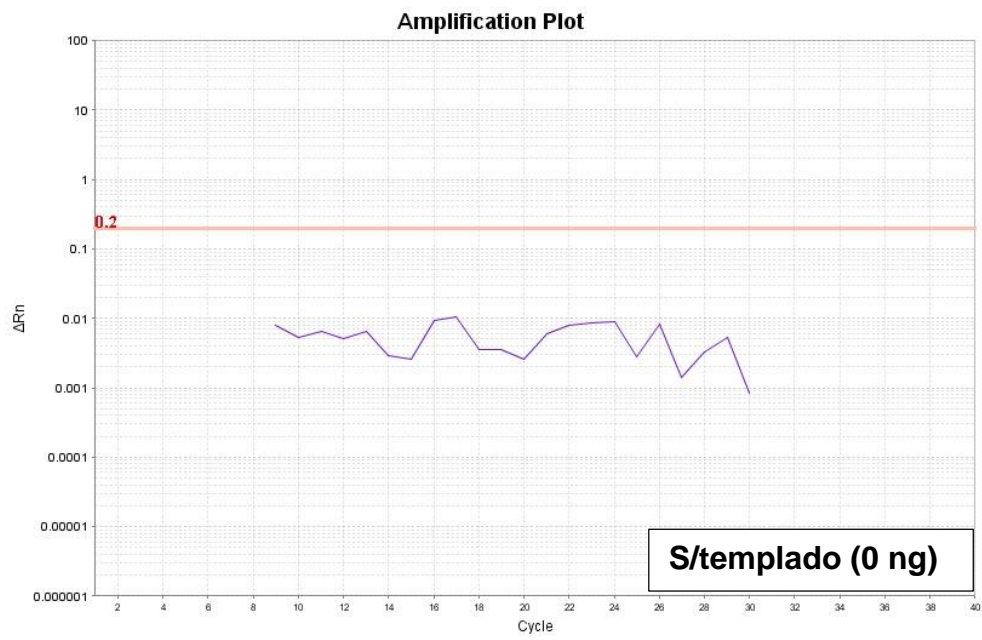
A.3



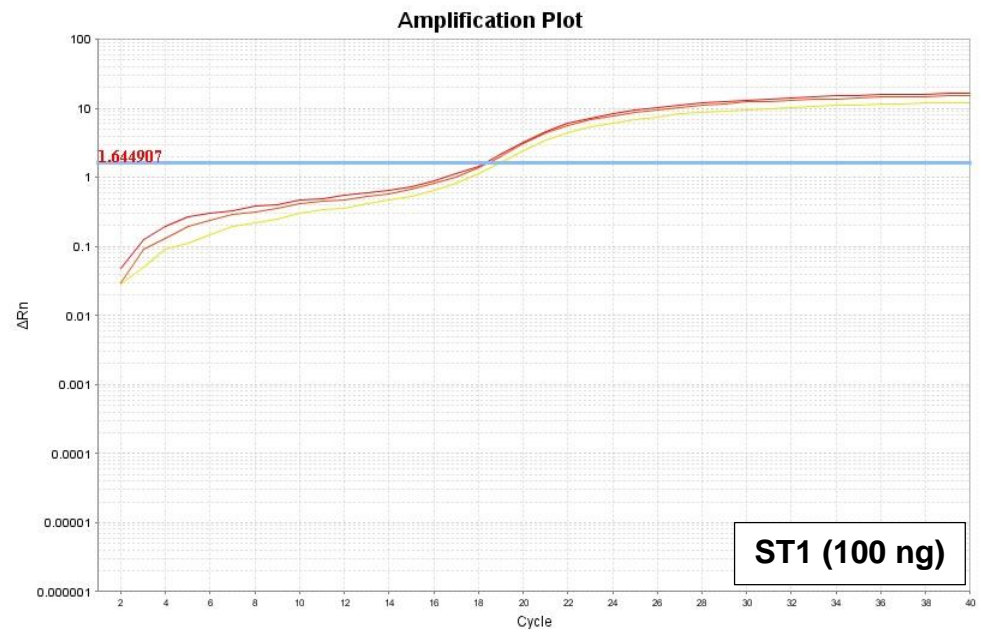
A.4



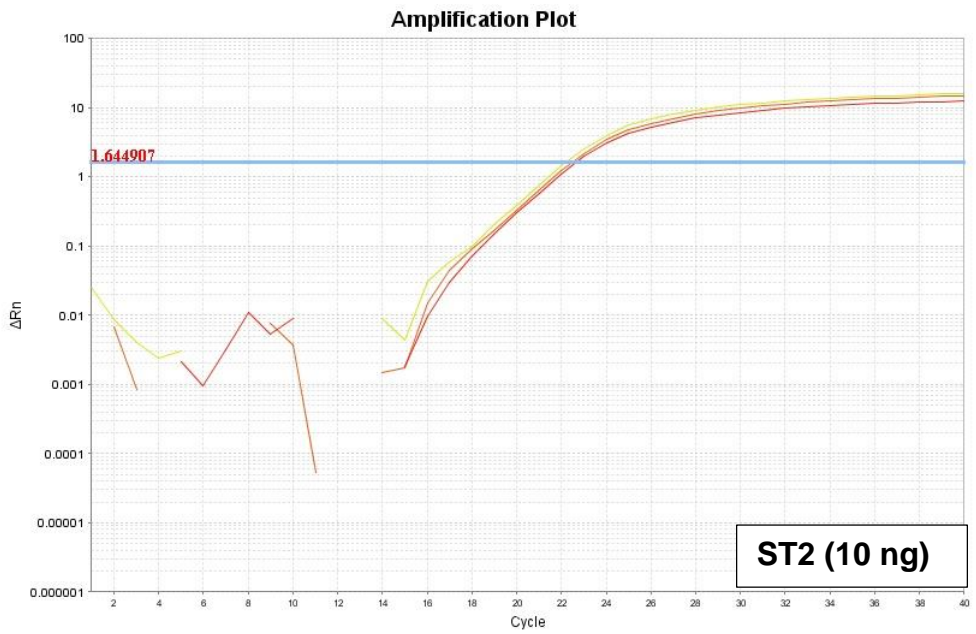
A.5



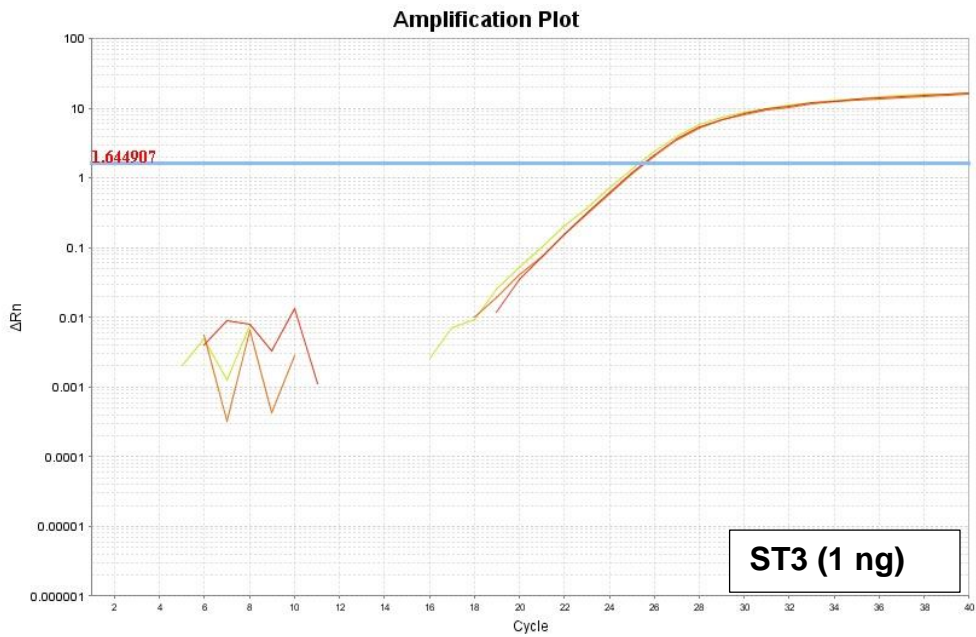
B.1



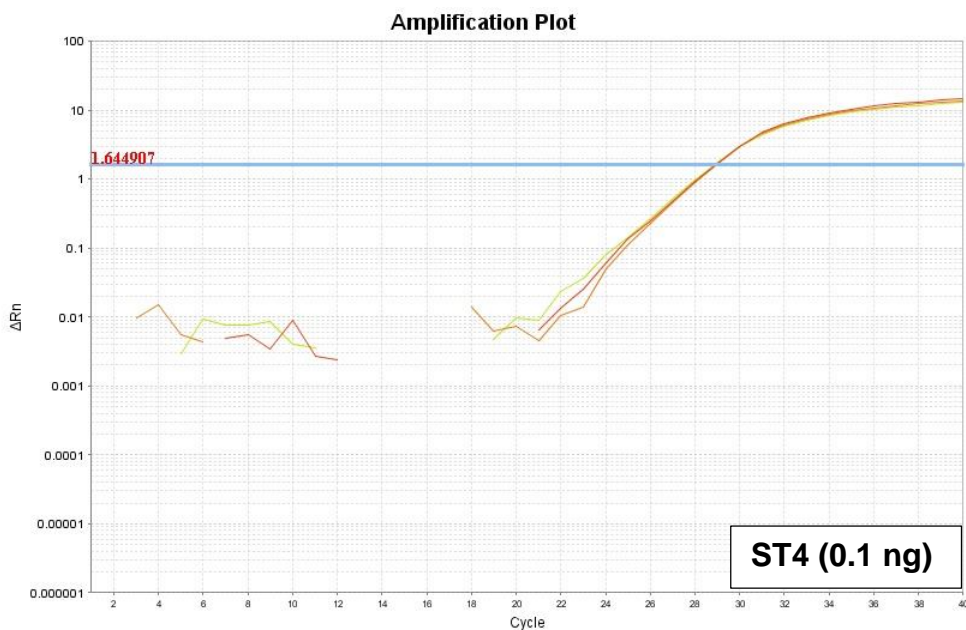
B.2



B.3



B.4



B.5

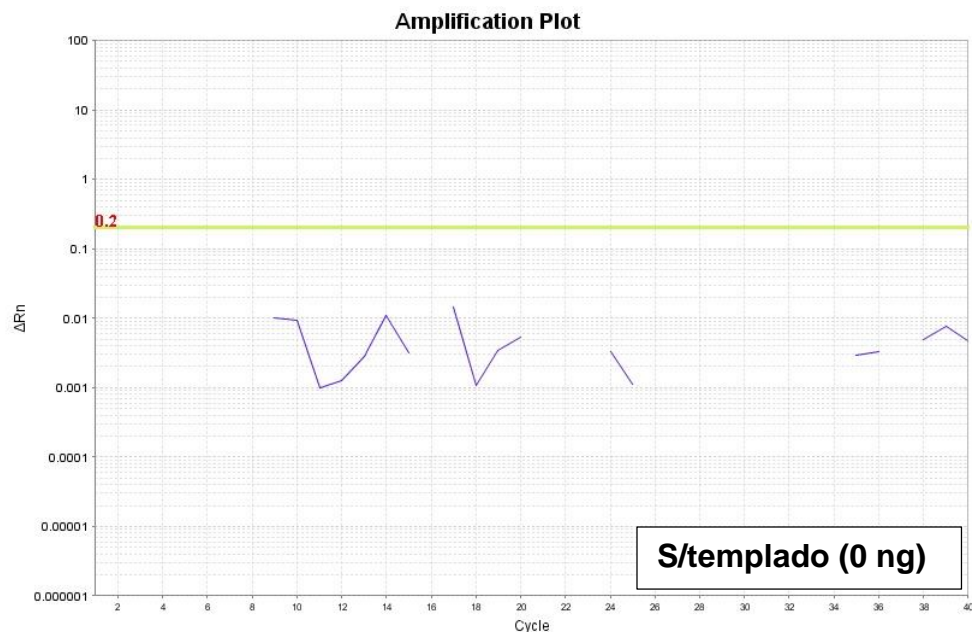


Figura 12. Curvas de amplificación de PCR tiempo real de Tc53 (A) y control endógeno GAPDH (B). ST1 (estándar 1), ST2 (estándar 2), ST3 (estándar 3), ST4 (estándar 4), s/templado (control negativo). En el recuadro inferior derecho se muestra la concentración de ADNc utilizado en cada caso.

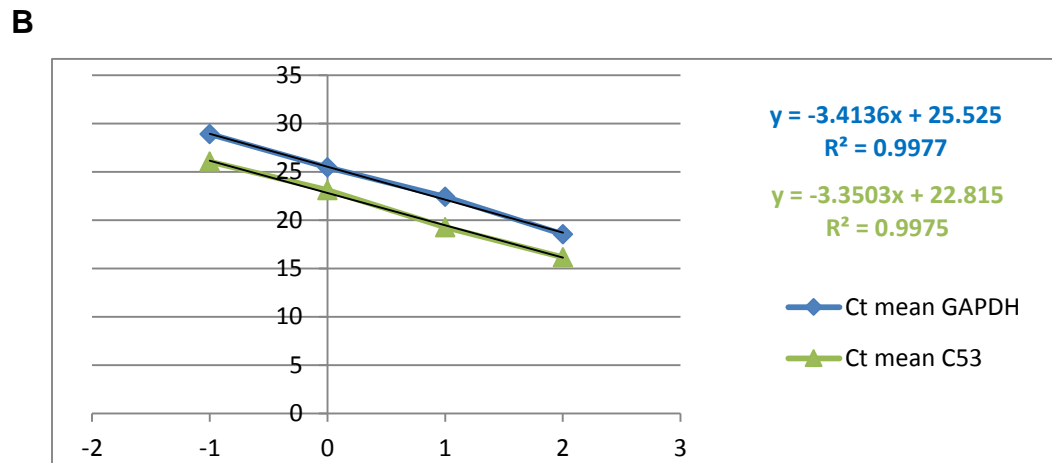
Para el análisis de expresión de cada una de las secuencias de la biblioteca evaluadas en este trabajo, nosotros utilizamos el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta$ Ct. Para este método de cuantificación, la eficiencia de amplificación del gen en estudio y el control endógeno (GAPDH) deben ser similares y cercanas al 100% (\pm 10%).

Para calcular la eficiencia de amplificación se utilizó la fórmula $E=(10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$, donde el valor de la pendiente se obtuvo mediante regresión lineal. Para ello, se obtuvo el logaritmo de las concentraciones utilizadas de ADNc y los valores de Ct (del inglés *cycle threshold*) obtenidos en los ensayos de tiempo real. Para cada muestra fue necesario correr de manera simultánea su propio control de GAPDH y determinar la eficiencia de amplificación para ambos casos (secuencia en estudio y secuencia de GAPDH) (**Tabla 3**).

En la **Figura 13** se muestra un ejemplo representativo del cálculo de eficiencia de amplificación de una de las 17 secuencias analizadas. Este ejemplo corresponde a la secuencia de C53, donde en la **Figura 13A** se muestran los datos del cálculo del logaritmo y los valores de la media del Ct de C53 y GAPDH. Estos valores se tomaron para realizar la regresión lineal y obtención de la pendiente (**Figura 13B**), necesario para realizar el cálculo de la eficiencia de amplificación. El resultado de estas eficiencias se muestra en la **Figura 13C** donde se obtuvieron eficiencias de 98.8% y 96.3% para C53 y GAPDH respectivamente. Este resultado nos indica que GAPDH puede ser utilizado como control endógeno en el ensayo final de expresión relativa de la secuencia C53. Cabe mencionar que una vez realizado el cálculo de eficiencia de amplificación (**Tabla 3**), se determinó que GAPDH era el control endógeno adecuado para los ensayos finales de PCR tiempo real de cada una de las 17 secuencias evaluadas.

A

	[cDNA]	Log[cDNA]	Ct mean GAPDH	Ct mean C53
ST1	100.17	2.00073767	18.5207348	16.16127777
ST2	10.017	1.00073767	22.4130192	19.2464962
ST3	1.0017	0.00073767	25.4375248	23.09603119
ST4	0.10017	-0.9992623	28.8911514	26.04580688



C

	Pendiente	Eficiencia
GAPDH	-3.4136	96.3115
C53	-3.3503	98.8229

Figura 13. Cálculo de la eficiencia de amplificación de C53 y GAPDH. A. Cálculo del logaritmo de las concentraciones de ADNc y valores de Ct obtenidos en las reacciones de PCR tiempo real de C53 y GAPDH. **B.** Gráfico de la regresión lineal de C53 y GAPDH donde se obtuvieron los valores de la pendiente. **C.** Tabla donde se muestra el valor de la pendiente y de la eficiencia de amplificación calculada para C53 y GAPDH.

Tabla 3. Rango dinámico y eficiencia de amplificación de las clonas de la biblioteca de substracción de FI y control endógeno GAPDH.

Clona	Rango Dinámico (ng de ADNc)	Conc. final (ng de ADNc)	Eficiencia Amplificación (%)	Rango Dinámico GAPDH (ng de ADNc)	Conc. Final (ng de ADNc) GAPDH	Eficiencia Amplificación GAPDH (%)
C3	0.1-100	1 y 10	107.82	0.1-100	1 y 10	105.35
C7	0.1-100	1 y 10	105.50	0.1-100	1 y 10	105.35
C9	0.1-10	1	97.12	0.1-10	1	98.76
C11	0.1-10	1	90.0	0.1-10	1	90.0
C16	0.1-100	1	98.25	0.1-10	1	98.76
C22	0.1-10	1	98.20	1-10	1	110.35
C23	0.1-10	1	94.78	0.1-10	1	91.66
C24	0.1-10	1	101.77	0.1-10	1	90.0
C26	0.1-100	1	93.55	0.1-10	1	110.35
C35	0.1-100	1 y 10	94.67	0.1-100	1 y 10	108.4
C41	0.1-10	1	98.55	0.1-10	1	94.99
C49	0.1-10	1	98.63	0.1-10	1	94.99
C52	0.1-100	1 y 10	93.43	0.1-100	1 y 10	96.31
C53	0.1-100	1 y 10	98.82	0.1-100	1 y 10	96.31
C59	0.1-100	1 y 10	92.7	0.1-100	1 y 10	97.9
C69	0.1-1	1	90.9	0.1-10	1	91.66
C80	0.1-10	1	90.34	0.1-100	1	97.9

Rango dinámico de 0.1-100 ng abarca las concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 ng, de ADNc. Rango dinámico de 0.1-10 ng abarca las concentraciones de 0.1, 1 y 10 ng de ADNc. Rango dinámico de 1-10 ng abarca las concentraciones de 1 y 10 ng de ADNc. Rango dinámico de 0.1-1 ng abarca las concentraciones de 0.1 y 1 ng de ADNc.

9.1.3. Análisis de expresión relativa de las clonas de la biblioteca de substracción de FI.

Como se mencionó anteriormente, a fin de corroborar la expresión diferencial de los transcritos obtenidos en la biblioteca de substracción de FI, se utilizó una técnica más sensible y cuantitativa en comparación a la utilizada previamente de *dot blot* (Sanchez-Cruz DG, Tesis de Maestría). Para esta validación llevamos a cabo ensayos de PCR tiempo real, usando ADNc de tripomastigotes y FI de *T. cruzi*.

Evaluamos un total de 17 secuencias, donde en 9 de estas (C3, C9, C22, C23, C24, C49, C52, C53 y C80) se confirmó se expresan más en la FI que en el tripomastigote (**Tabla 4, secuencias marcadas en color rojo**). Este resultado nos confirmó la obtención exitosa de la biblioteca de substracción de FI de *T. cruzi*. En el caso de las 8 secuencias restantes (C7, C11, C16, C26, C35, C41, C59 y C69) se observó que se expresan preferentemente en tripomastigotes respecto a FI (**Tabla 4, secuencias marcadas en color negro**). Este resultado era de esperarse, ya que en cualquier trabajo de este tipo lo normal es que conforme se aumenta la astringencia en el análisis se van descartando algunos candidatos, pero confirmando los candidatos con más posibilidades de éxito que participen en el proceso biológico evaluado. En este sentido nosotros consideramos que las secuencias que se expresan preferencialmente en la FI (C3, C9, C22, C23, C24, C49, C52, C53 y C80) pudieran ser importantes y participar durante el proceso de diferenciación de *T. cruzi*.

Para demostrar la hipótesis anterior seleccionamos la secuencia C49, que tiene una expresión de 3.6 veces más en FI respecto a tripomastigote (**Tabla 4**) para los estudios posteriores. Seleccionamos la clona C49 ya que es la secuencia que mostró la mayor expresión de todas las secuencias analizadas y la nombramos Tc49 de este momento en adelante.

No. Clona	Nivel de expresión relativa de FI /T (Fold change)	± DESV. STD.	No. Clona	Nivel de expresión relativa de FI /T (Fold change)	± DESV. STD.
	FI3	N=2 (c/u por Triplicado)		FI3	N=2 (c/u por Triplicado)
C3	1.42	+ 0.1347	C35	0.88	+ 0.9057
C7	1.09	+ 0.7381	C41	1.29	+ 0.6630
C9	3.03	+ 0.1157	C49	3.625	+ 0.0696
C11	0.046	+ 19.602	C52	1.69	+ 0.2852
C16	0.88	+ 0.9740	C53	2.82	+ 0.2869
C22	2.40	+ 0.0233	C59	0.25	+ 2.2058
C23	1.83	+ 0.0527	C69	1.377	+ 0.7177
C24	1.31	+ 0.0915	C80	2.75	+ 0.1496
C26	1.3137	+ 0.5423			

Tabla 4. Corroboración de la expresión diferencial de las clonas de la biblioteca de substracción de FI por una técnica cuantitativa (RT-PCR tiempo real). Se evaluaron un total de 17 secuencias; en color rojo se muestran las secuencias que se expresan diferencialmente y en color negro secuencias que no se expresan diferencialmente en forma intermedia (FI) respecto a tripomastigotes (T). Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes cada uno por triplicado.

9.2. Evaluación de los niveles de expresión de ARN mensajero de Tc49 en los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi*.

Para conocer la expresión de *Tc49* en todos los estadios de desarrollo de *T. cruzi*, realizamos ensayos de PCR tiempo real utilizando ADNc de epimastigotes, tripomastigotes, FI y amastigotes. En la **Figura 14** se muestra el resultado de la expresión relativa en todas las formas parasitarias de *T. cruzi*, en donde se observa la expresión preferentemente en la FI respecto a las otros estadios del parásito (epimastigote, tripomastigote y amastigote). La expresión preferente de *Tc49* en la FI podría sugerir que el producto de este transcrito pudiera estar relacionado de alguna manera a una función específica en esta forma intermedia del parásito. En

este sentido, nosotros proponemos que Tc49 podría estar participando en el proceso de diferenciación de *T. cruzi* donde es obligatorio el paso a estas FIs para llegar al estadio de desarrollo final.

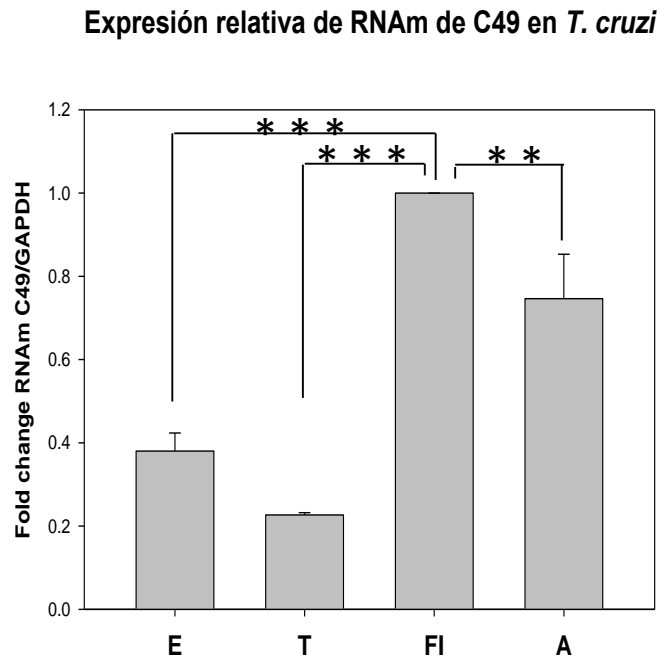


Figura 14. Evaluación de los niveles de expresión de ARNm de Tc49 en los diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi*. Expresión relativa de ARNm de Tc49 en los estadios de desarrollo de epimastigote (E), tripomastigote (T), forma intermedia (FI) y amastigote (A), mediante RT-PCR tiempo real. N=3 * * *P ≤ 0.001 * *P ≤ 0.01

9.3. Evaluar la participación de Tc49 en el proceso de diferenciación de *T. cruzi*.

9.3.1. Obtener parásitos *knock down* mediante ARN antisentido.

9.3.1.1. Clonación de la secuencia de 70 pb de *Tc49* de *T. cruzi* en pTREXn.

Para evaluar la participación de Tc49 en el proceso de diferenciación del parásito, decidimos utilizar la inhibición de la expresión del ARNm de Tc49. Para ello, utilizamos la expresión de un transcrito antisentido exógeno para la obtención de parásitos *knock down* de Tc49. Esta estrategia de ARN antisentido ya ha sido utilizada con éxito en análisis de genética reversa en protozoos parásitos (Militello KT and Refour P, 2008), incluyendo a *T. cruzi* (Allaoui A y cols., 1999).

Cabe mencionar que no es posible utilizar estrategias de ARN interferente en *T. cruzi*, ya que este parásito carece del gen *AGO1* (Ullu E y cols., 2004). Además, aun cuando *Tc49* es de copia única, tampoco optamos por la obtención de parásitos *knock out*. Esto se debió por un lado, a que es una estrategia compleja que requiere de mucho tiempo y presenta el riesgo de no poder analizar genes esenciales cuando no se cuenta con un sistema inducible para la expresión simultánea de una copia exógena del gen, que es nuestro caso. Además, en otros trabajos de nuestro laboratorio analizamos otras clonas de la biblioteca de substracción que eran genes multicopia, por lo que no era opción la obtención de parásitos *knock out*. Debido a que obtuvimos resultados exitosos y a que los parásitos *knock down*, al no haber un abatimiento total de la expresión de un gen, permite analizar genes esenciales decidimos utilizar este mismo abordaje.

Para la estrategia de ARN antisentido se han propuesto dos mecanismos para la inhibición de la expresión de la proteína. El primer mecanismo es la degradación del ARNm endógeno por la unión del transcrito antisentido y su posterior degradación por la ARNasa H y por lo tanto al no existir suficiente ARNm

no se producirá suficiente proteína. Cuando el transcrito antisentido es dirigido al extremo 5' del transcrito blanco se ha propuesto un segundo mecanismo en donde se inhibe la traducción debido a que el ribosoma no se une por impedimento estérico al transcrito blanco y al no haber traducción de ARNm endógeno no se producirá proteína (Militello KT y Refour P, 2008). En este sentido, se ha propuesto que los transcritos antisentidos dirigidos al extremo 5' del ARNm blanco, pueden llevar a cabo ambos mecanismos haciendo más eficiente el sistema (Juliano RL y cols., 2005).

Por lo tanto, para llevar a cabo la estrategia de ARN antisentido se clonó una secuencia de los primeros 70 pb de *Tc49* en orientación antisentido, en el vector pTREXn. De esta manera generamos transcritos antisentidos exógenos complementarios al extremo 5' del ARNm endógeno de *Tc49*. Además, el vector de clonación pTREXn utilizado contiene un promotor homólogo fuerte de ARNr que permite la expresión constitutiva a niveles altos de la secuencia clonada. El tamaño de secuencia de 70 pb utilizado fue determinado con base a lo ya descrito en la literatura, donde secuencias de este tamaño se han utilizado con éxito en otros sistemas, donde aparentemente además de producir la degradación del ARNm complementario también inhibió su traducción (Juliano RL y cols., 2005).

Para la amplificación de la secuencia de 70 pb de *Tc49*, primeramente se obtuvo ARN total de FI, el cual fue tratado con ADNasa para eliminar el ADN contaminante y que no interfiriera en las reacciones posteriores. Como control se utilizó una reacción sin tratar con ADNasa. Como se muestra en la **Figura 15A** tanto el ARN total tratado y sin tratar con ADNasa, mostraron las bandas características de ARN ribosomal de 24S α y β , así como la de 18S. Este resultado indicó que la muestra de ARN total a utilizar para las siguientes reacciones se encontraba en condiciones integras y que el tratamiento con ADNasa no degradó la muestra de ARN.

Posteriormente, se realizó la obtención de ADNc utilizando únicamente ARN total tratado con ADNasa, y como control la misma reacción pero sin

retrotranscriptasa. Para la obtención de ADNc, se utilizó un oligonucleótido dT y la retro-transcriptasa, y posteriormente el producto obtenido se amplificó por PCR usando el mismo oligonucleótido dT más el oligonucleótido RDEME. Como se muestra en la **Figura 15B**, se obtuvo un producto que corre en forma de barrido en un gel de agarosa en el caso donde se agregó la retro-transcriptasa y no así cuando no se agregó la enzima. Este resultado indicó que el producto de amplificación proviene del ADNc y no de contaminación de ADN en la muestra.

Por último, mediante PCR y utilizando el ADNc obtenido se amplificó la secuencia de 70 pb de *Tc49*. Como control positivo se utilizó una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos de tripanina y como control negativo una reacción pero sin templado. Como se muestra en la **Figura 15C** se obtuvo el producto de amplificación de 70 pb correspondiente al peso molecular esperado para *Tc49*. Así como la amplificación de un producto de 1382 pb correspondiente al peso molecular de tripanina utilizado como control positivo. Mientras que no hubo amplificación en el control negativo utilizado. Este resultado nos indicó la correcta obtención del producto de 70 pb y la especificidad de la amplificación.

Para la clonación del producto de 70 pb en el vector pTREXn, se digirió tanto el producto de PCR de 70 pb como el ADN del vector pTREXn, con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*. En la **Figura 15D** se muestra la obtención de los productos digeridos en el peso molecular esperado, de 70 pb y 6300 pb, para *Tc49* y pTREXn respectivamente. Este resultado nos indicó la correcta digestión de *Tc49* y pTREXn, y que los productos eran adecuados para realizar la reacción de ligación. Una vez realizada la ligación, el producto fue utilizado para transformar bacterias DH5 α y analizar las colonias resistentes al antibiótico de selección (ampicilina). En la **Figura 15E** se muestra el resultado de dos clonas analizadas por PCR de colonia con oligonucleótidos específicos para la secuencia de *Tc49*, donde se observa los productos de amplificación en el peso molecular esperado de 70 pb. Este resultado nos indicó la clonación de la secuencia de 70 pb correspondiente a *Tc49* en el vector pTREXn, obteniendo así la construcción pTREXn*Tc49* antisentido.

Para corroborar la correcta clonación de la secuencia de 70 pb de *Tc49* en el vector pTREXn, la construcción pTREXnTc49 antisentido fue secuenciada. En la **Figura 16** se observa el alineamiento del resultado de la secuenciación, donde se observa que la secuencia fue clonada en fase y que no hubo ningún cambio de base. Además se observa que la secuencia de *Tc49* fue insertada en orientación antisentido. Este resultado demostró la correcta clonación de la secuencia de 70 pb de *Tc49* en orientación antisentido en el vector pTREXn.

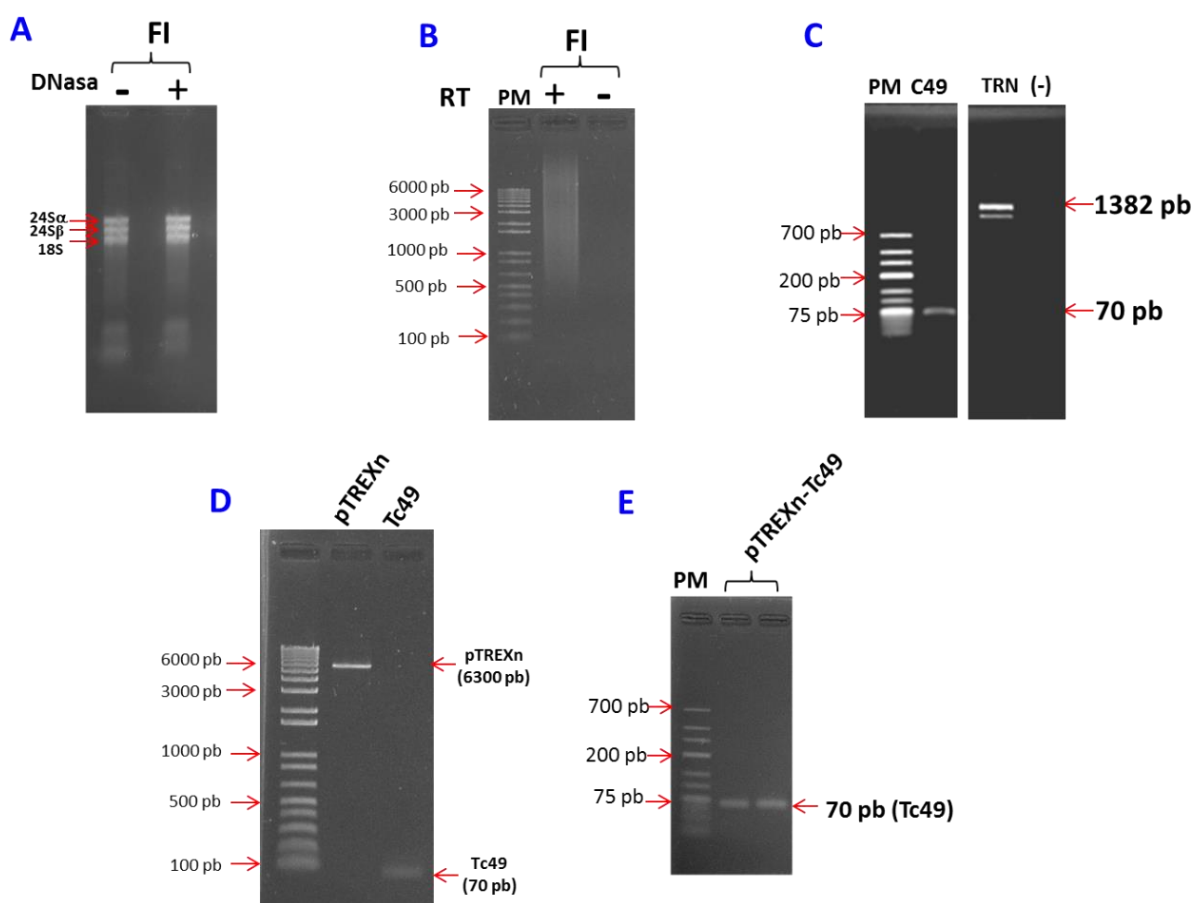


Figura 15. Clonación de la secuencia de 70 pb de *Tc49* en orientación antisentido en el vector pTREXn. **A.** Obtención de ARN total de FI. **B.** Obtención de ADNc de FI. **C.** Amplificación de la secuencia de 70 pb de *Tc49*, TRN (tripanina) fue utilizado como control positivo, y como control negativo (-) una reacción de PCR sin oligonucleótidos. **D.** Digestión de la secuencia de *Tc49* y pTREXn con las enzimas *HindIII* y *XhoI*. **E.** PCR de colonia para la confirmación de la ligación de pTREXnTc49.

```

                                HindIII      Tc49
pTREXC49antisense      ATNGTTGACTTGTCTAGAAATTCGATATCAAGCTTCCATGAGTGGGGGAGAAAAGGAAGCA 360
pTREXC49-HX1           -----TCTTGTCTAGAAATTCGATATCAAGCTTCCATGAGTGGGGGAGAAAAGGAAGCA 53
                        :*****
                                XhoI
pTREXC49antisense      GCGGCACCGCCCTCGGGTAGACGTACGAGTCCAGAGACAACATCTCGAGCCATTGTGG-- 418
pTREXC49-HX1           GCGGCACCGCCCTCGGGTAGACGTACGAGTCCAGAGACAACATCTCGAGCCATTACGA 113
                        *****

```

Figura 16. Secuenciación y alineamiento de la construcción pTREXnTc49 antisentido. pTREXC49antisense representa la construcción de pTREXnTc49 antisentido obtenida *in silico*. pTREXC49-HX1 representa la secuencia obtenida a partir de la secuenciación con el oligonucleótido HX1 de la construcción pTREXnTc49 antisentido. HindIII y XhoI, sitios de restricción utilizados para la clonación de la secuencia en orientación antisentido. Tc49, representa la secuencia de 70 pb clonada en orientación antisentido.

9.3.1.2. Generación de epimastigotes transfectantes estables con la construcción pTREXnTc49 antisentido.

Con la finalidad de generar parásitos transfectantes estables que expresaran el transcrito antisentido complementario al ARNm de Tc49, se electroporaron epimastigotes silvestres de la cepa CL Brener, con ADN de pTREXnTc49 antisentido, ADN de pTREXn sin inserto como control *mock* y ADN de pTREXn-GFP como control de transfección y de eficiencia de selección. Estos últimos parásitos transfectados se utilizaron como control, ya que por un lado expresan una secuencia no relacionada (proteína verde fluorescente) y por el otro facilitan el seguimiento *in vivo* del progreso de la transfección. Una vez transfectados los epimastigotes con las construcciones antes mencionadas, se sometieron a dos rondas de selección con G418 a una concentración de 500 µg/mL, dejando entre ellas un tiempo sin el antibiótico para eliminar los parásitos transfectados que no recombinaron las secuencias de interés en su genoma. Una vez que los parásitos transfectados con pTREXn-GFP llegaron al 100% de parásitos resistentes y fluorescentes, de manera indirecta sugirió que el resto de los parásitos 100% resistentes al antibiótico podrían ya ser transfectantes estables. Para confirmar lo anterior, las diferentes poblaciones

de parásitos se dejaron por un periodo de una o dos semanas sin el antibiótico y después se colocaron nuevamente con el antibiótico, no observándose muerte confirmando que se obtuvieron parásitos transfectantes estables.

9.3.2. Evaluación de la expresión del ARN antisentido y disminución del ARN mensajero de Tc49 mediante RT-PCR tiempo real.

Para demostrar la obtención de parásitos *knock down*, se realizó la evaluación de la expresión del transcrito antisentido y disminución del ARN mensajero de Tc49 en parásitos transfectantes estables. Primero, se evaluó la expresión del transcrito antisentido de Tc49 mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Como se esquematiza en la **Figura 17A**, se utilizó el oligonucleótido Tc49 antisense que alinea con la secuencia de *Tc49* y InGAPDH con la secuencia del vector pTREXn. Este diseño experimental asegura únicamente la amplificación del transcrito antisentido exógeno y no la amplificación del ARN mensajero endógeno de Tc49. Para el ensayo de PCR se utilizó ADNc obtenido de parásitos transfectantes estables pTREXnTc49, y como control ADNc de parásitos transfectantes estables pTREXn y parásitos silvestres (WT). El resultado se muestra en la **Figura 17B** donde se observa la obtención de un producto de ~120 pb en los parásitos transfectantes estables pTREXnTc49, mientras que en los parásitos control *mock* (pTREXn) y silvestres (WT) no hubo amplificación. Este resultado nos indicó que los parásitos transfectantes estables pTREXnTc49 expresan el transcrito antisentido de Tc49.

Una vez confirmada la expresión del transcrito antisentido de Tc49, el siguiente paso fue evaluar la expresión del ARNm de Tc49 mediante PCR tiempo real. En este ensayo se utilizó ADNc obtenido de parásitos transfectantes estables pTREXnTc49 y como control ADNc de parásitos transfectantes estables pTREXn (*mock*) y parásitos silvestres (WT). El resultado se muestra en la **Figura 18**, donde se observa una disminución de hasta un 50% en los niveles de expresión del ARNm de Tc49 en parásitos transfectantes estables pTREXnTc49, comparado con los

parásitos control *mock* y silvestres. Este resultado demostró la obtención de parásitos *knock down* de Tc49 e indicó que la estrategia de ARN antisentido es funcional en nuestro sistema.

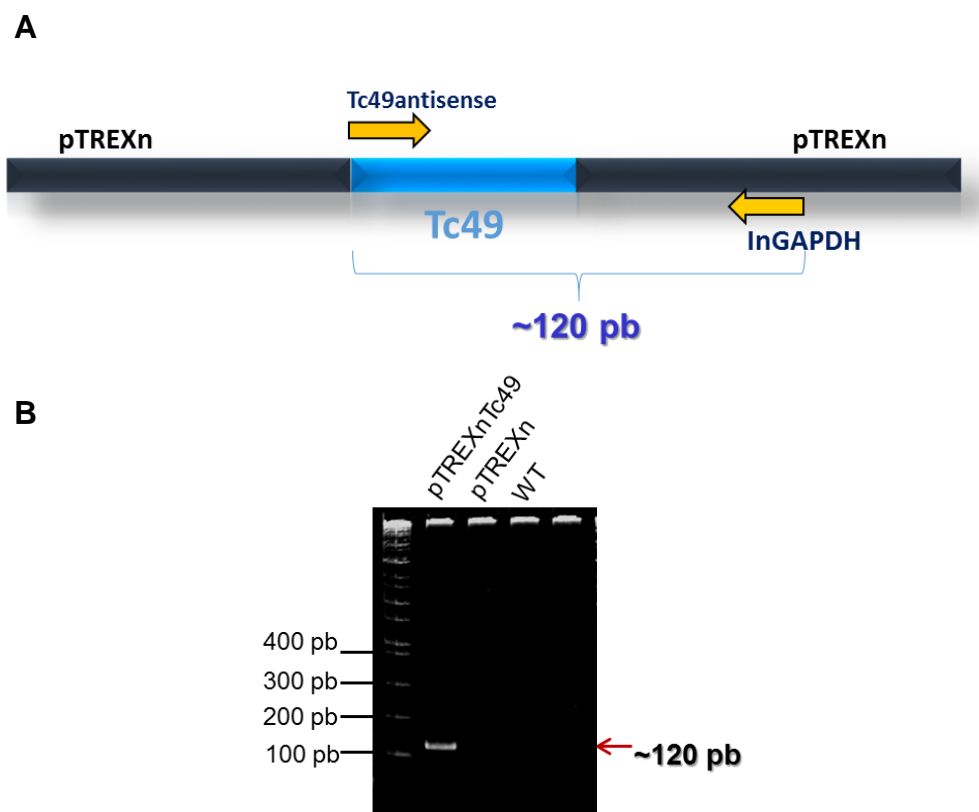


Figura 17. Determinación de la expresión del transcrito antisentido de Tc49, por RT-PCR. A.- Esquema representativo de la construcción pTREXnTc49 antisentido donde en azul se representa los primeros 70 pb de la secuencia *Tc49* clonada en orientación antisentido en el vector pTREXn (color negro). Las flechas amarillas representan los oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT-PCR. El oligonucleótido Tc49 antisense alinea con la secuencia de *Tc49* y InGAPDH alinea con la secuencia del vector pTREXn, asegurando la amplificación únicamente del transcrito antisentido de Tc49. **B.-** PCR con ADNc obtenido de parásitos transfectantes estables (pTREXnTc49), control *mock* (pTREXn) y silvestres (WT).

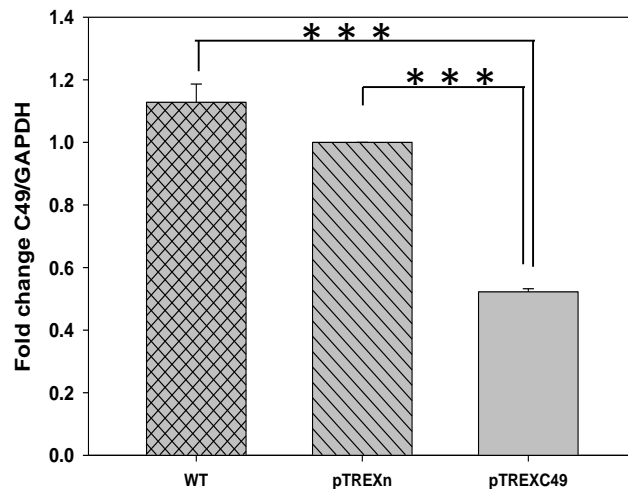


Figura 18. Expresión del ARNm de Tc49 en parásitos transfectantes estables. Determinación de la expresión relativa de ARNm, por RT-PCR tiempo real, en parásitos transfectantes estables (pTREXC49), control *mock* (pTREXn) y silvestres (WT). N=3 * * *P ≤ 0.001

9.3.3. Evaluar la capacidad de crecimiento de los parásitos *knock down* y controles.

Una vez obtenidos los parásitos *knock down* de Tc49, como paso siguiente evaluamos la capacidad de crecimiento de éstos mediante una cinética de crecimiento. Esto es con la finalidad de confirmar que no hay un defecto generalizado en los parásitos transfectados. Como control se utilizaron parásitos *mock* (pTREXn) y silvestres (WT). El resultado se muestra en la **Figura 19**, donde se observa que no hay diferencia significativa en la tasa de crecimiento de los parásitos *knock down* de Tc49 respecto a los parásitos silvestres y control *mock*. Además como parte de la evaluación se analizó la morfología de los parásitos *knock down* mediante microscopía óptica, donde no se observó algún defecto en forma y tamaño comparado con los parásitos silvestres y control *mock* (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que la disminución del ARNm de Tc49 en los parásitos *knock down*, no afecta su capacidad de crecimiento ni su morfología.

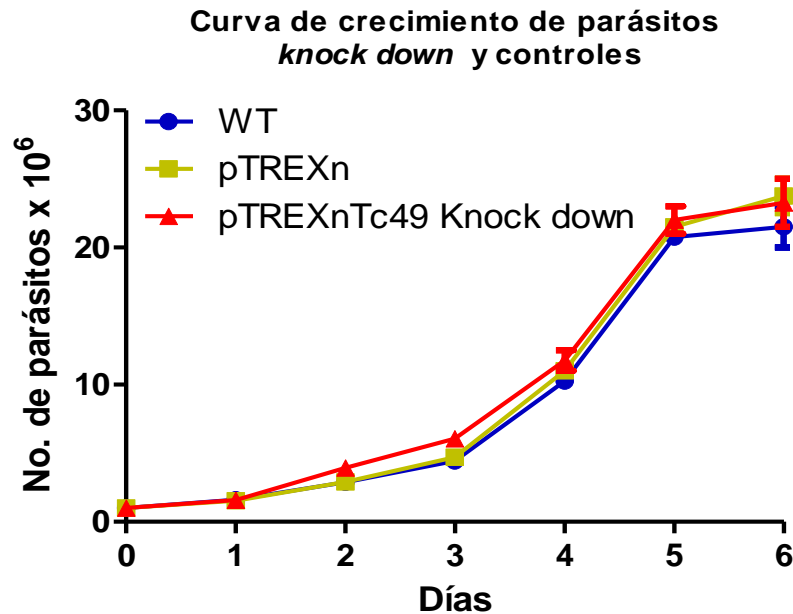


Figura 19. Cinética de crecimiento de parásitos *knock down* de Tc49 de *T. cruzi*. Curva de crecimiento de epimastigotes en medio LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino, incubados a 28 °C durante 6 días. Parásitos *knock down* (pTREXnTc49 *knock down*), control *mock* (pTREXn) y silvestres (WT). N=3.

9.3.4. Evaluación de la capacidad de diferenciación de parásitos *knock down* de Tc49 de *T. cruzi*.

9.3.4.1. En infecciones en fibroblastos 3T3 NIH.

a. Transformación extracelular

Como se mencionó anteriormente, para evaluar la participación de Tc49 en la diferenciación de *T. cruzi*, se obtuvieron parásitos *knock down* de Tc49. Ya que la secuencia de *Tc49* fue obtenida de una biblioteca de substracción de FI con respecto a tripomastigotes, era necesario evaluar funcionalmente a los parásitos *knock down* en experimentos de amastigogénesis secundaria *in vitro*. Por lo tanto para obtener tripomastigotes era necesario primero realizar experimentos de

infección *in vitro* con epimastigotes *knock down* y control y recuperar los tripomastigotes liberados de células infectadas, para su posterior evaluación en ensayos de amastigogénesis secundaria. Además, lo anterior también permitiría evaluar todo el curso del proceso de infección, que incluye en más de uno de sus pasos la diferenciación del parásito.

Primeramente, analizamos la capacidad de transformación extracelular de los epimastigotes *knock down* y control, utilizados para iniciar las infecciones en fibroblastos 3T3 NIH. En estas condiciones los epimastigotes sufren un proceso de diferenciación hacia tripomastigotes y amastigotes a las 48 horas post-infección. Para ello se cuantificó el porcentaje de epimastigotes, tripomastigotes, Fls y amastigotes en el sobrenadante de las infecciones a las 48 horas post-infección. Los resultados se muestran en la **Figura 20A** donde se observa una disminución en la eficiencia de transformación extracelular de epimastigote hacia amastigote. Esta disminución fue de un 58% en los parásitos *knock down* de Tc49 comparado con los parásitos silvestres y control *mock*.

Este resultado indica que la disminución en la expresión de *Tc49* afecta la eficiencia de transformación de epimastigotes hacia amastigotes, sugiriendo que Tc49 participa en el proceso de diferenciación de *T. cruzi*.

b. Infección

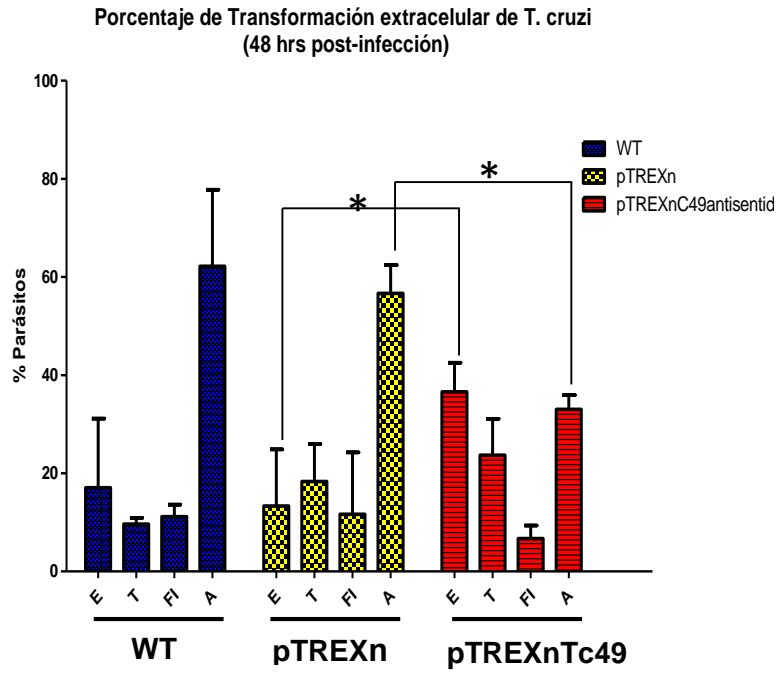
Para continuar con la evaluación de la participación de Tc49 en el proceso de diferenciación del parásito, continuamos analizando el proceso de infección. Durante este proceso los tripomastigotes obtenidos de la diferenciación de los epimastigotes en el sobrenadante de las células infectadas, penetran a las células a través de una vacuola parasitófora, para posteriormente salir y diferenciarse a amastigotes y multiplicarse en el citosol, en donde los amastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes y entonces se liberan de la célula. De tal manera que evaluar la eficiencia de infección es una manera indirecta de evaluar la diferenciación intracelular. De este modo y utilizando tinciones con DAPI se

determinó el porcentaje de células infectadas. El ensayo de infección se realizó utilizando la misma cantidad de parásitos *knock down*, control *mock* y silvestres, donde primeramente evaluamos el porcentaje de células infectadas durante una cinética a diferentes tiempos de 6, 8, 10, 12 y 14 días post-infección. Los resultados se muestran en la **Figura 20B**, donde se observa que los parásitos control *mock* y silvestres tienen una cinética de infección similar durante todos los tiempos evaluados, llegando hasta casi un 100% de células infectadas al día 14 post-infección. En el caso de los parásitos *knock down* esta cinética fue diferente, se observa que a los 6, 8 y 10 días post-infección no existe diferencia significativa en el porcentaje de células infectadas comparada con los controles. Mientras que a los 12 y 14 días post-infección se observa una disminución en el porcentaje de células infectadas de hasta un 40% y 30% respectivamente, comparado con los parásitos control *mock* y silvestres. Cabe mencionar que aun cuando no se obtuvo diferencia significativa en los parásitos *knock down* a los días 6, 8 y 10 post-infección en comparación con los controles (*mock* y silvestres), sí se observó una tendencia a mantener el mismo nivel de infección a través del tiempo, a diferencia de los controles, en donde como es lo normal, aumentan progresivamente el número de células infectadas. Cuando analizamos las veces de cambio de número de células infectadas en las células *knock down* con respecto a las células control se observó una disminución de 1.6 (día 12) y 1.28 (día 14) veces menos células infectadas en los *knock down* de Tc49.

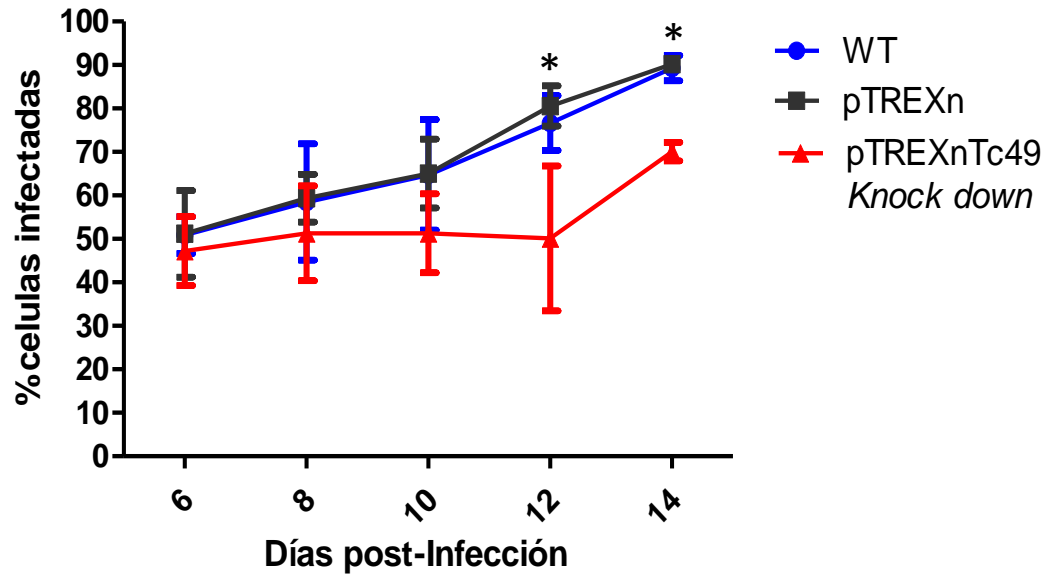
Estos resultados se pueden observar en la **Figura 20C**, donde las micrografías de las tinciones con DAPI de parásitos control y *knock down* a los tiempos 6, 8 y 10 días post-infección, no mostraron diferencia en el número de células infectadas. Mientras que a los 12 y 14 días post-infección, se observa un menor número de células infectadas en los parásitos *knock down* respecto al control *mock* y silvestres. Estos resultados como se mencionó anteriormente sugieren la importancia de Tc49 en algún paso del proceso de infección intracelular de *T. cruzi*.

Para evaluar a que nivel del proceso de infección intracelular se encontraba el defecto, primero nos preguntamos si los tripomastigotes liberados durante la infección primaria, tienen la misma capacidad de infectar que los parásitos control. Para ello se pusieron a interaccionar la misma cantidad de tripomastigotes liberados de infecciones primarias iniciadas con epimastigotes *knock down*, control *mock* y silvestres, con las células blanco por 2 horas y se evaluó la eficiencia infección después de 48 horas. Realizamos tinciones con DAPI y cuantificamos el número de células infectadas. El resultado se muestra en la **Figura 21**, donde se observa que no hay diferencia significativa en el porcentaje de células infectadas con los parásitos *knock down* comparado con los parásitos control *mock* y silvestres. Este resultado sugiere que el defecto de los parásitos *knock down* durante la infección intracelular, no está en su capacidad de entrar a la célula blanco y que por lo tanto el defecto se encuentra en otro paso posterior del proceso de infección intracelular.

A



B



C

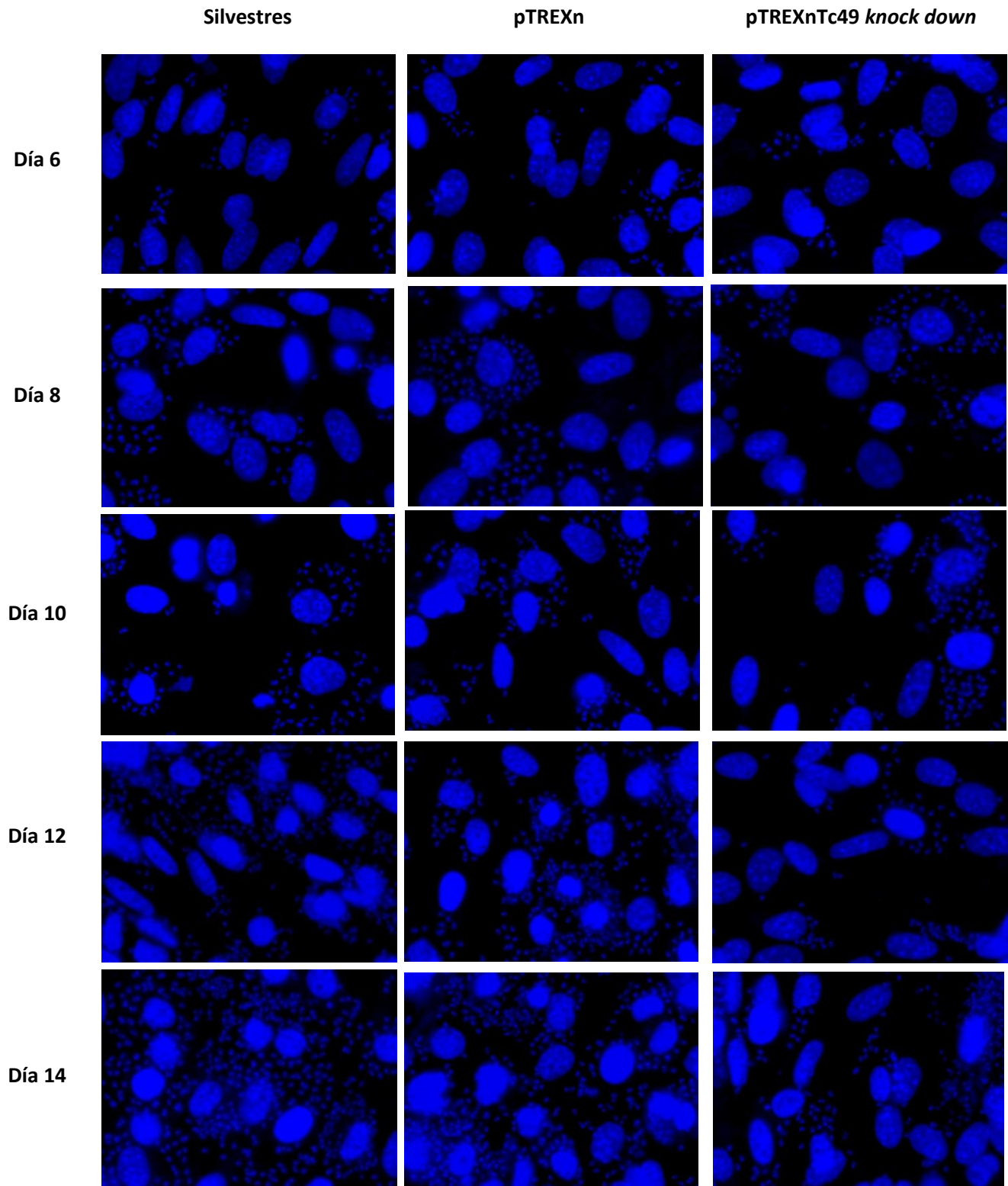


Figura 20. Evaluación de la participación de Tc49 en la diferenciación de *T. cruzi*. A.- Porcentaje de transformación extracelular de epimastigotes *knock down*

y controles a 48 horas post-infección. **B.-** Cinética de infección con epimastigotes *knock down* y controles, durante 14 días post-infección. **C.-** Fluorescencias representativas de la cinética de infección con epimastigotes *knock down* y controles, durante 14 días post-infección. Las tinciones fueron realizadas con DAPI para teñir el núcleo y cinetoplasto de los parásitos y el núcleo de fibroblastos 3T3 NIH. Todos los experimentos se realizaron en monocapas de fibroblastos 3T3 NIH en medio DMEM suplementado con 2% suero fetal bovino en una atmosfera de CO₂ al 5% a 37 °C. Parásitos *knock down* (pTREXnC49antisentido o pTREXnTc49 *knock down*), control *mock* (pTREXn) y silvestres (WT). epimastigotes (E), tripomastigotes (T), formas intermedias (FI) y amastigotes (A). N=3 P_≤0.05.

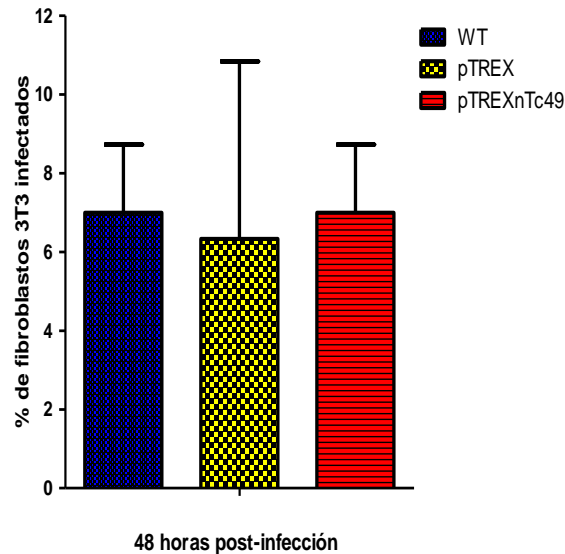


Figura 21. Evaluación de la eficiencia de infección de parásitos *knock down* de Tc49 a las 48 horas post-infección. Porcentaje de células infectadas a las 48 horas post-infección. Las infecciones se realizaron con tripomastigotes obtenidos de infecciones primarias con parásitos *knock down* (pTREXnTc49), control *mock* (pTREXn) y silvestres (WT). Las infecciones se realizaron en monocapas de fibroblastos 3T3 NIH en medio DMEM suplementado con 2% suero fetal bovino en una atmosfera de CO₂ al 5% a 37 °C. N=3.

Continuando con la evaluación del proceso de infección intracelular, el siguiente paso fue determinar si el defecto se encontraba a nivel de diferenciación del tripomastigote recién entrado a la célula, que se transforma a amastigote en las primeras 48 horas post-infección. Los resultados mostraron que en todos los casos ya no había presencia de tripomastigotes (datos no mostrados) y que por el contrario, únicamente se observaba la presencia de amastigotes indicando la transformación intracelular de los tripomastigotes a amastigotes. Como se muestra en la **Figura 22**, el análisis cuantitativo de estos experimentos reveló que tanto los parásitos *knock down* como control (*mock* y silvestres), no tienen diferencias significativas en su eficiencia de diferenciación de tripomastigotes a amastigotes. Además, en la gran mayoría de las células ya se presentaban dos amastigotes por célula, indicando que la multiplicación del parásito ya había iniciado. Al igual que en el experimento de la cinética de infección, en este experimento aun cuando no se observó diferencias significativas y hubo una tendencia a disminuir en los parásitos *knock down*. Estos resultados indican que la ausencia de Tc49 no tuvo un efecto deletéreo en la diferenciación intracelular de tripomastigotes a amastigotes y el inicio de su multiplicación, al menos en lo que concierne a la población de parásitos *knock down*.

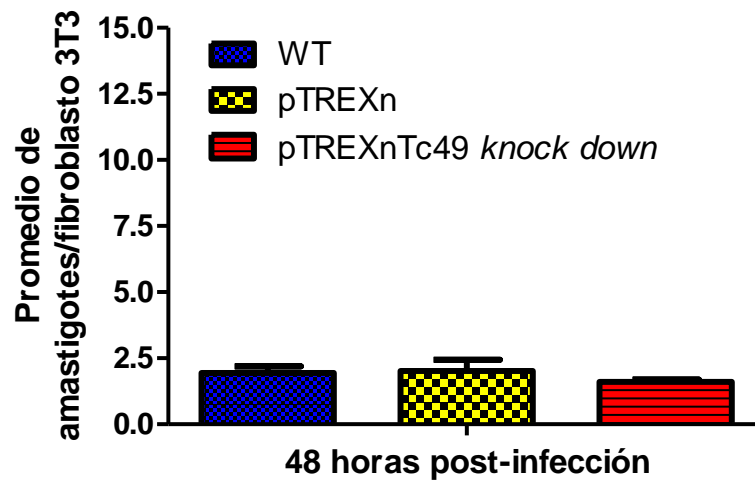


Figura 22. Evaluación del proceso de multiplicación de parásitos *knock down* de Tc49 a las 48 horas post-infección. Promedio de amastigotes por célula infectada a las 48 horas post-infección. Las infecciones se realizaron con tripomastigotes obtenidos de infecciones primarias con parásitos *knock down* (pTREXnTc49), control *mock* (pTREXn) y silvestres (WT). Las infecciones se realizaron en monocapas de fibroblastos 3T3 NIH en medio DMEM suplementado con 2% suero fetal bovino en una atmosfera de CO₂ al 5% a 37 °C. N=3.

A continuación evaluamos si el defecto se encontraba a nivel de multiplicación activa de amastigotes. Este proceso de multiplicación, lo valoramos cuantificando el número de amastigotes en tinciones con DAPI a los 6 y 8 días post-infección, en donde es posible valorar la completa multiplicación del parásito antes de iniciar su diferenciación hacia tripomastigote. El resultado se muestra en la **Figura 23** donde se observa que no existe diferencia significativa en el promedio de amastigotes por célula infectada a los 6 y 8 días post-infección en los parásitos *knock down* comparado con los parásitos control *mock* y silvestres. Este resultado muestra que el proceso de multiplicación activa de los parásitos *knock down* no se encuentra afectado, sugiriendo que el defecto de los parásitos *knock down* durante la infección intracelular está en un punto posterior del proceso de infección.

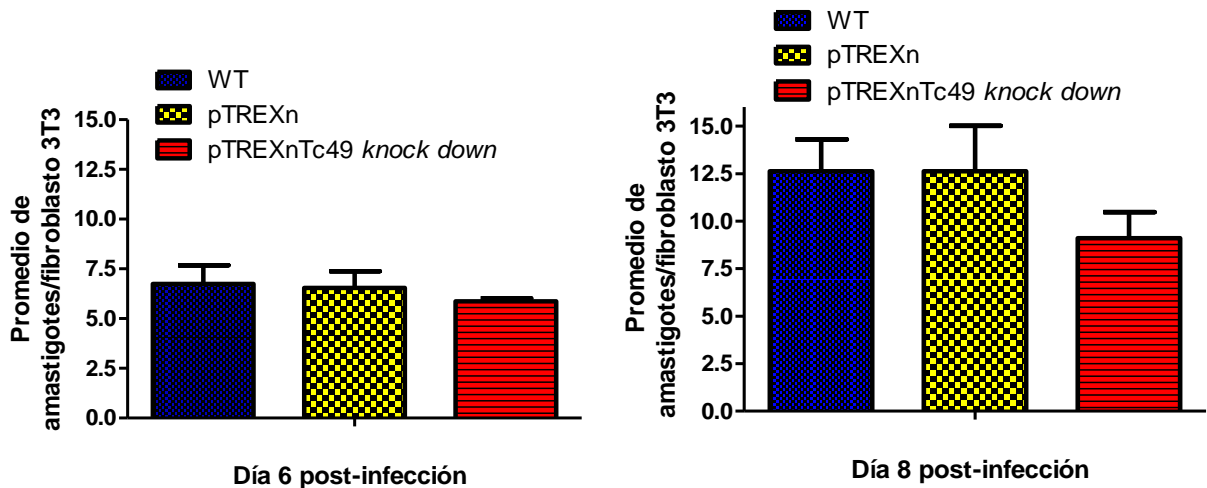


Figura 23. Evaluación del proceso de multiplicación de parásitos *knock down* y controles, a los 6 y 8 días post-infección. Cuantificación del promedio de amastigotes por célula infectada. El ensayo se realizó mediante tinciones con DAPI de infecciones con parásitos *knock down* (pTREXnTc49), control *mock* (pTREXn) y silvestres (WT). El resultado es el promedio de tres experimentos independientes.

Otro paso donde pudiese estar afectado el proceso de infección es a nivel de la diferenciación de amastigotes a tripomastigotes, por lo que evaluamos esta posibilidad. Para ello cuantificamos el número de tripomastigotes por célula infectada, mediante tinciones con DAPI durante la cinética de infección (6, 8 y 10 días post-infección). Únicamente fue posible evaluar estos tiempos, ya que a tiempos posteriores el gran número de parásitos por célula impide realizar una cuantificación confiable. El resultado se muestra en la **Figura 24**, donde se observa que no hay diferencia significativa en el promedio de tripomastigotes por célula durante las infecciones con los parásitos *knock down* respecto al control *mock* y silvestres. Este resultado sugiere que Tc49 no tiene un papel en la diferenciación intracelular de amastigotes a tripomastigotes.

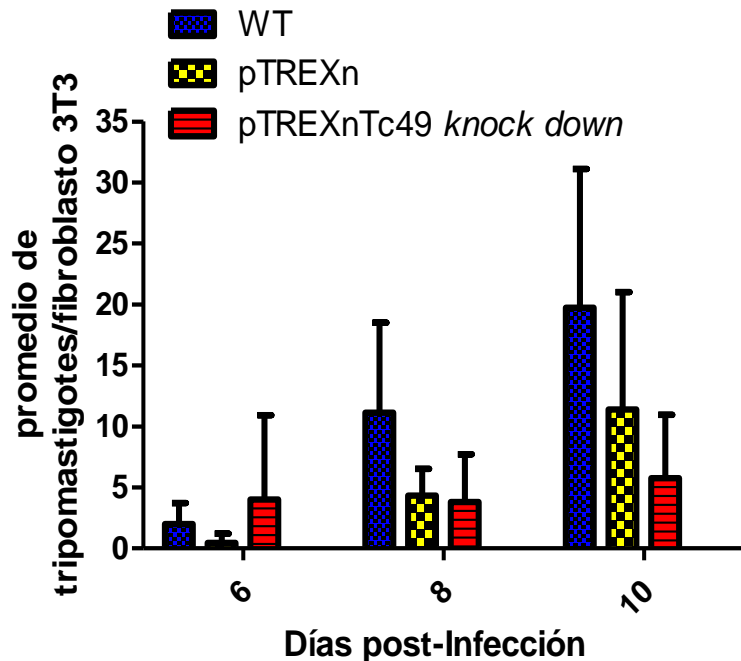


Figura 24. Cuantificación del número de tripomastigotes intracelulares durante la cinética de infección. Promedio de tripomastigotes por célula infectada. El ensayo se realizó mediante tinciones con DAPI de infecciones con parásitos *knock down* (pTREXnTc49), control *mock* (pTREXn) y silvestres (WT) a 6, 8, 10 y 12 días post-infección. El resultado es el promedio de tres experimentos independientes.

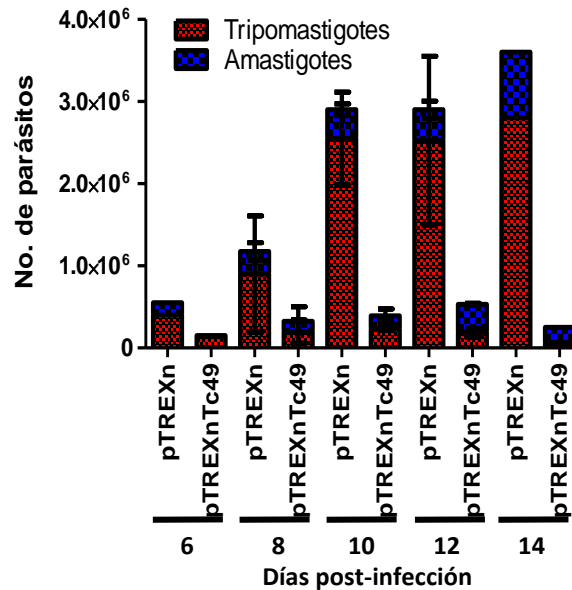
Finalmente analizamos el último paso del proceso de infección intracelular, que es la liberación de los parásitos al medio extracelular. A la fecha no se conoce el mecanismo ni las moléculas que participan. Se han propuesto tres posibilidades para la salida del parásito, la primera es que la gran cantidad y activo movimiento de los tripomastigotes dentro de la célula, pudieran romper mecánicamente a ésta. Otra posibilidad es que los tripomastigotes a través de la expresión de ciertas moléculas pudiera mediar de manera regulada su salida. Y finalmente, que la sobrevivencia del parásito dentro de la célula, utilice a tal grado la maquinaria de la célula hospedera que termine por llevarla a ésta a la muerte y por lo tanto a la liberación del parásito.

Para determinar el número de parásitos liberados se realizó la cuantificación de parásitos *knock down* y control *mock* (pTREXn) en el sobrenadante de las células infectadas durante la cinética de infección a los 6, 8, 10, 12 y 14 días post-infección. Como los parásitos silvestres y control *mock* en todos los experimentos anteriores no mostraron diferencias, en este experimento solo incluimos a los parásitos control *mock* y *knock down*. El resultado se muestra en la **Figura 25A** donde se observa que la cinética de liberación de parásitos *knock down* es significativamente diferente comparado con los parásitos control *mock*. Donde en los parásitos control se observa una cinética de liberación de parásitos que aumenta conforme el tiempo, empezando con 0.5×10^6 parásitos/ml al día 6 hasta llegar a 3×10^6 parásitos/ml al día 12 y 14 post-infección. Mientras que en los parásitos *knock down* no se ve este mismo comportamiento, manteniéndose una liberación de parásitos alrededor de 0.5×10^6 parásitos/ml en todos los tiempos evaluados. Cuando analizamos las veces de cambio de parásitos liberados en las células *knock down* con respecto a las células control (3.6 al día 6, 3.6 al día 8, 7.43 al día 10, 5.45 al día 12 y 14.4 al día 14) se observó una disminución de hasta 14 veces menos parásitos en los *knock down* de Tc49.

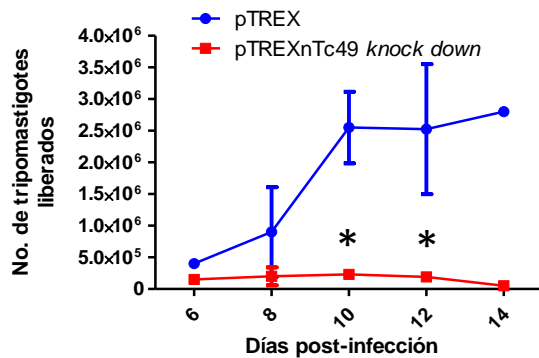
Estos resultados muestran que los parásitos *knock down* están siendo liberados en menor número que los parásitos control *mock*. El resultado anterior es un reflejo del número total de parásitos liberados, lo que incluye tripomastigotes y amastigotes. Por lo tanto, a fin de saber si esta disminución de parásitos liberados es en la misma o diferente proporción en tripomastigotes y amastigotes, analizamos ambas formas de desarrollo del parásito por separado. Al cuantificar el número de tripomastigotes liberados (**Figura 25B**) se observa una cinética de disminución muy similar a la observada en la cinética de liberación de parásitos totales (**Figura 25A**), pero la proporción de tripomastigotes disminuyó hasta 14.4 veces menos a los 14 días post infección en los parásitos *knock down* respecto al control *mock*. Por el contrario, al cuantificar el número de amastigotes liberados (**Figura 25C**) se observa que no hay diferencia significativa en el número de parásitos *knock down* respecto al control *mock*. Estos resultados en conjunto indican que la disminución total de

parásitos liberados es un reflejo directo de la disminución de los tripomastigotes y no de los amastigotes.

A



B



C

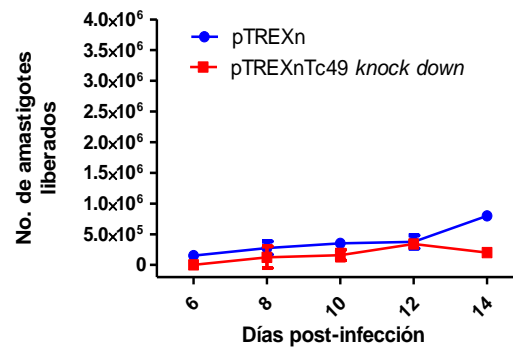


Figura 25. Evaluación de la capacidad de liberación de parásitos *knock down* y control *mock* durante una cinética de infección. A. Cuantificación del número de parásitos totales. **B.** Cuantificación del número de tripomastigotes liberados. **C.** Cuantificación del número de amastigotes liberados. Todos los experimentos se realizaron cuantificando el número de parásitos liberados al sobrenadante durante una cinética de infección a 6, 8, 10, 12 y 14 días post-infección. N=2 $P \leq 0.05$.

Para evaluar la proporción de tripomastigotes con respecto a amastigotes y viceversa, normalizamos el número total de parásitos liberados a 100% tanto de los parásitos knock down como control y calculamos el porcentaje correspondiente de cada forma del parásito. Esto lo evaluamos durante la cinética a los 8, 10, 12 y 14 días post-infección. El resultado se muestra en la **Figura 26**, donde se observa que los parásitos *knock down* tienen una proporción de tripomastigotes que disminuye progresivamente de un 80% al día 8 hasta un 20% al día 14 post-infección. Mientras que en los parásitos control *mock* se observó una cinética de liberación con una proporción que se mantiene en un 80-90% de tripomastigotes respecto a amastigotes. Estos resultados muestran más claramente que el defecto en la liberación de parásitos es únicamente en los tripomastigotes *knock down*.

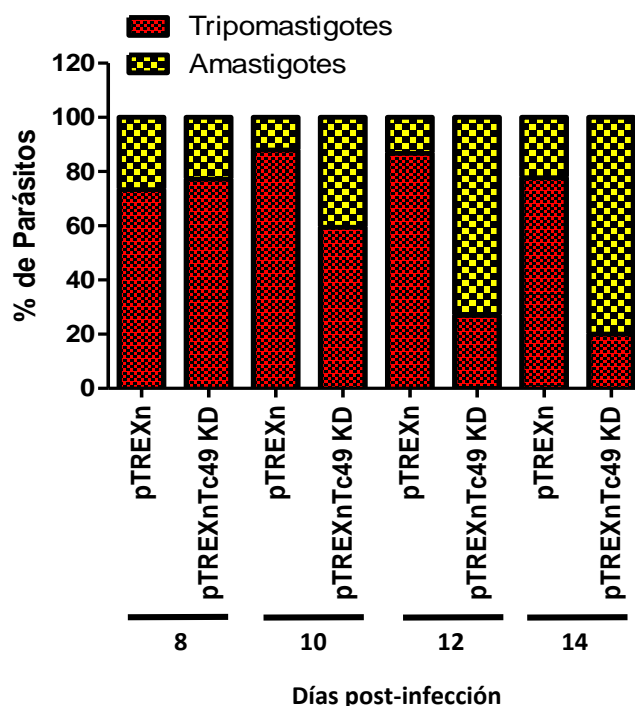


Figura 26. Evaluación del porcentaje de parásitos *knock down* liberados durante una cinética de infección. Cuantificación del número de tripomastigotes y amastigotes liberados al sobrenadante durante 8, 10, 12 y 14 días post-infección. N=2.

9.3.4.2. Amastigogénesis secundaria *in vitro*.

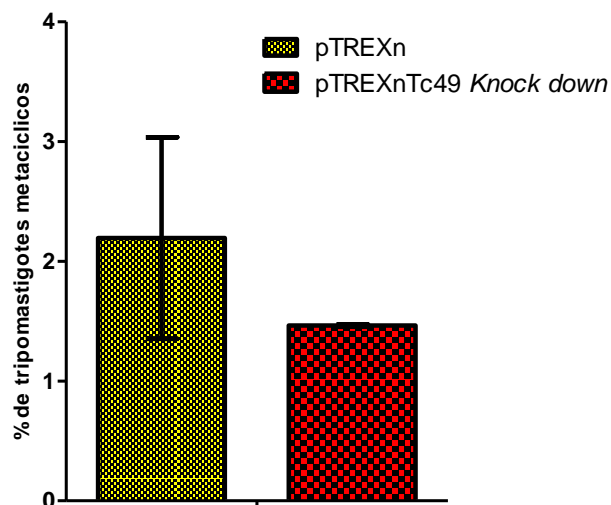
El siguiente experimento a evaluar fue la amastigogénesis secundaria *in vitro*, en donde esperamos ver el efecto deletéreo más obvio, ya que es en este proceso de diferenciación en donde se identificó la expresión diferencial de Tc49 en la formas intermedia de transición de tripomastigotes hacia amastigotes. A pesar de que en las infecciones con los parásitos *knock down* sí se obtuvieron tripomastigotes en el sobrenadante, la cantidad de éstos fue muy baja. Además, la proporción de tripomastigotes y amastigotes era muy similar, lo que dificulta técnicamente hablando, la purificación de los tripomastigotes. Esto en conjunto limitó de manera determinante la factibilidad de realizar los experimentos de amastigogénesis secundaria *in vitro*. Cabe mencionar que se realizaron 5 experimentos distintos, en donde nos enfrentamos a los dos problemas técnicos antes mencionados, que nos imposibilitaron a obtener el resultado final. A este respecto consideramos que en experimentos futuros se necesitaría optimizar las técnicas para la purificación de los tripomastigotes de los sobrenadantes de células infectadas y el escalar los experimentos de infección en al menos de 10 a 15 veces más, para poder mejorar las posibilidades de éxito técnico de estos experimentos.

9.3.4.3. Metaciclogénesis *In vitro*

Ya que en los experimentos de diferenciación extracelular en los parásitos *knock down* de Tc49, se observó un defecto en la transformación de epimastigotes hacia amastigotes, era necesario evaluar si otros procesos de transformación del parásito también estaban afectados. Esta posibilidad está apoyada además por reportes en la literatura, en donde se ha demostrado que la misma molécula puede participar en más de un proceso de diferenciación (Hashimoto M y cols., 2014).

Para ello realizamos ensayos de metaciclogénesis *in vitro*, incubando parásitos *knock down* de Tc49 y control *mock*, en medio artificial de orina de triatómino (TAU3AAG) como describe en materiales y métodos. Al igual que en los

experimentos de liberación de parásitos, en este experimento solo incluimos a los parásitos control *mock* y *knock down*, ya que los parásitos silvestres y *mock* no mostraron diferencias en experimentos anteriores. Los resultados se muestran en la **Figura 27**, donde se observa que no hubo diferencia significativa en el porcentaje de transformación de epimastigotes hacia tripomastigotes metacíclicos en los parásitos *knock down* comparado con el control *mock*. Al igual que en los



experimentos de multiplicación de amastigotes (**Figura 22 y 23**) y de número de tripomastigotes por célula al día 10 post-infección (**Figura 24**), durante la metaciclogénesis de los parásitos *knock down* también se observó una tendencia a la baja, aun cuando ésta no fue significativa. Estos resultados indican que Tc49 no participa en la metaciclogénesis de *T. cruzi*.

Figura 27. Metaciclogénesis *in vitro* de parásitos *knock down* de Tc49. Porcentaje de tripomastigotes metacíclicos diferenciados a partir de epimastigotes *knock down* (pTREXnTc49 *knock down*) y control *mock* (pTREXn). El ensayo de metaciclogénesis *in vitro* fue realizado con epimastigotes envejecidos durante 7 días y posteriormente incubados en medio TAU3AAG por 5 días. N=2, $P \leq 0.05$.

10. Discusión

T. cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, presenta diferentes estadios de desarrollo durante su ciclo de vida que se alternan entre un hospedero mamífero (que incluye al humano) y un insecto vector (triatómino). Durante su ciclo biológico el parásito está expuesto a diferentes condiciones de nutrientes, temperatura y pH, las cuales juegan un papel importante en el proceso de diferenciación del parásito. Este proceso de diferenciación es determinante para la sobrevivencia de *T. cruzi* y el establecimiento de la patogenia de la enfermedad de Chagas.

Aun cuando se conocen los pasos generales del proceso de infección y diferenciación, es poco lo que se conoce de las proteínas y mecanismos moleculares involucrados. Por ello, en nuestro laboratorio se estableció un sistema de amastigogénesis secundaria *in vitro*, en donde se obtiene la diferenciación de tripomastigotes obtenidos de infecciones celulares hacia amastigotes, con la obtención de las diferentes FIs puras y que fueron caracterizadas con anterioridad (Hernández-Osorio LA y cols., 2010). Esto permitió realizar estudios de expresión diferencial de transcritos de una de estas FIs con respecto a tripomastigotes a través de una biblioteca de substracción, obtenida utilizando la técnica de RDE. El análisis por *dot blot* de una alícuota de la biblioteca, identificó 37 secuencias distintas con una expresión diferencial (Sánchez-Cruz DG, 2009; Tesis de Maestría).

En este trabajo continuamos con el análisis de los resultados anteriores y determinamos que 23 de las 37 secuencias (73%), cumplen con el criterio de punto de corte de una $E \leq 1 \times 10^{-6}$ en el análisis de identidad de su secuencia. De las 23 secuencias anteriores, encontramos que 17 (46% de las 37 iniciales) caen dentro del punto de corte de ≥ 100 pb de tamaño de secuencia obtenida en la biblioteca. Además, para el análisis de identidad se eliminaron las secuencias redundantes, lo que permite mejorar aún más su correcta identificación. Estos tres criterios en conjunto ($E \leq 1 \times 10^{-6}$, ≥ 100 pb de tamaño de secuencia y eliminación de secuencias redundantes) nos permitieron tener una mayor certeza en la identificación de las

secuencias en estudio, ya que cumplen con los criterios que son utilizados normalmente en este tipo de trabajos (Minning TA y cols., 2003, Baptista CS y cols., 2004).

Una vez finalizado el análisis anterior, procedimos a corroborar la expresión diferencial de las 17 secuencias que cumplieron con todos los criterios de corte, utilizando para ello una técnica cuantitativa y más sensible a la previamente usada. Por lo tanto, estudios de RT-PCR tiempo real confirmaron que 9 (24% de las 37 iniciales) de las 17 secuencias (53%) tienen una clara expresión diferencial en la FI respecto a tripomastigote (**Tabla 4**). Este resultado es de esperarse, ya que en cualquier trabajo de este tipo se sabe que conforme se aumenta la astringencia en el análisis se van descartando algunos candidatos y confirmando los candidatos con mayores posibilidades de participar en el fenómeno en estudio, que en nuestro caso corresponde al proceso de diferenciación (Minning TA y cols., 2003; Baptista CS y cols., 2004; Ayub MJ y cols, 2009).

Los resultados anteriores además, nos permitieron seleccionar a *Tc49* para continuar con su caracterización en este trabajo de investigación, ya que es la secuencia con la mayor expresión diferencial (3.6 veces de cambio) en la FI respecto a tripomastigote (**Tabla 4**). *Tc49* está anotada como hipotética en el genoma de *T. cruzi*, y el análisis *in silico* más profundo hecho en este trabajo de investigación confirmó que no tiene homología con ninguna secuencia o dominios con función conocida reportada en las bases de datos.

El análisis de expresión del *Tc49* en todos los estadios de desarrollo (epimastigote, tripomastigote derivado de células infectadas, FI y amastigote) del parásito, determinó que su transcrito está en mayor cantidad en la FI respecto a todas las otras formas parasitarias analizadas (**Figura 14**). Estos datos sugirieron que *Tc49* pudiera estar relacionada de alguna manera, a una función en la forma intermedia obtenida durante la amastigogénesis secundaria de *T. cruzi*,

posiblemente en particular en el proceso de diferenciación del parásito (Navarro MC y cols., 2003; Hernández-Osorio LA y cols., 2010).

Para comprobar nuestra hipótesis, decidimos utilizar la inhibición de la expresión del ARNm de *Tc49*, utilizando una estrategia de genética reversa y la obtención de parásitos *knock down* que expresen una secuencia antisentido al transcrito de *Tc49* (**Figura 17 y 18**). Esta estrategia ha sido utilizada con éxito en *T. cruzi* por diferentes grupos de investigación (Tovar J y Fairlamb AH, 1996; Málaga S y Yoshida N, 2001; Okura M y cols., 2005; Araya JE y cols., 2008; Hashimoto M y cols., 2014) y por nuestro grupo (Rubio-Ortiz M, 2012, Tesis de Maestría); así como, en otros parásitos (Militello KT y Refour P, 2008) y sistemas eucariontes (Qi Z y Mi R, 2016).

Para llevar a cabo la estrategia de ARN antisentido se clonó una secuencia de los primeros 70 pb de la región codificante de *Tc49* en orientación antisentido, en el vector pTREXn (**Figura 15 y 16**). De esta manera generamos transcritos antisentidos exógenos complementarios al extremo 5' del ARNm endógeno de *Tc49*. Este mismo abordaje ya ha sido utilizado con éxito en otros sistemas, donde aparentemente además de producir la degradación del ARNm complementario también inhibe su traducción (Juliano RL y cols., 2005). El análisis de los parásitos transfectados estables mostró la clara presencia del transcrito antisentido por RT-PCR tiempo final (**Figura 17B**) y la disminución de aproximadamente dos veces menos nivel de ARNm endógeno, evaluado por RT-PCR tiempo real (**Figura 18**). Este resultado demuestra la disminución del transcrito endógeno, sugiriendo su degradación de acuerdo al mecanismo propuesto en la literatura (Juliano RL y cols., 2005). Nosotros esperaríamos que el nivel de la proteína este también afectado, al menos en la misma proporción en que disminuyó el transcrito, o incluso que su disminución sea en una mayor proporción si consideramos que simultáneamente se esté afectando tanto la transcripción como la traducción. Ya que no contamos con el Ab anti *Tc49*, no fue posible evaluar esta última posibilidad siendo necesarios experimentos futuros para corroborar esto.

Con el objetivo de determinar que los epimastigotes *knock down* no presentaran un defecto generalizado, era necesario evaluar su replicación mediante una cinética de crecimiento. Los resultados revelaron que no hubo efectos deletéreos comparado con los controles *mock* y silvestres (**Figura 19**), indicando que Tc49 no está implicado a este nivel. Esto es de esperarse, ya que *Tc49* fue identificada durante el proceso de diferenciación de tripomastigote hacia amastigote, por lo que no pensaríamos que los parásitos *knock down* tuvieran un defecto en el crecimiento de los parásitos. Además, mediante microscopía óptica evaluamos si los epimastigotes *knock down* presentaban algún defecto en su morfología y/o movimiento (Datos no mostrados). Los resultados observados indicaron que tampoco hubo defectos morfológicos y de movilidad, por lo que al igual que en el crecimiento del parásito, estos resultados indican que Tc49 no es importante para la morfología y movimiento de *T. cruzi*. En conjunto, estos resultados indicaron que los epimastigotes *knock down* no presentan un defecto generalizado.

Ya que habíamos demostrado la obtención de los parásitos *knock down* y que estos no presentaban un defecto general, procedimos a su caracterización fenotípica, evaluando la participación de Tc49 en los diferentes pasos del proceso de infección. Para ello infectamos células en cultivo en donde es posible monitorear los diferentes pasos del ciclo intracelular de infección del parásito (diferenciación extracelular de epimastigotes a tripomastigotes y amastigotes, entrada del parásito, diferenciación de tripomastigote hacia amastigote, multiplicación, diferenciación de tripomastigote hacia amastigote y salida). Además, esto era un paso indispensable inicial, ya que para llevar a cabo los experimentos de amastigogénesis secundaria era necesario obtener tripomastigotes *knock down* de Tc49 provenientes de infecciones iniciadas con los epimastigotes *knock down* de Tc49 obtenidos. Como controles se utilizó a parásitos silvestres (WT) y parásitos *mock* (pTREXn).

Primeramente, evaluamos la capacidad de transformación extracelular de los epimastigotes *knock down* comparado con los parásitos control (**Figura 20A**). Hay que recordar que en las condiciones de infección que utilizamos, los epimastigotes de la cepa CI-Brener sufren un proceso de diferenciación hacia tripomastigotes y amastigotes en el sobrenadante de las células infectadas (Manning-Cela R y cols., 2001). Durante este ensayo, se observó en los parásitos *knock down* de Tc49, una disminución de aproximadamente 2 veces en la eficiencia de transformación extracelular de epimastigote hacia amastigote y el consecuente aumento de epimastigotes sin transformar, comparado con los parásitos control *mock* y silvestres (**Figura 20A**). Al mismo tiempo el número de tripomastigotes en todos los casos se mantuvo a un nivel similar, lo que indica que el proceso de transformación de epimastigotes a amastigotes está afectado y no así el de epimastigotes a tripomastigotes. Esto sugiere, que Tc49 está participando en la amastigogénesis y no en la tripomastigogénesis del parásito.

Este resultado sugiere por tanto, que al menos en lo referente a la participación de Tc49, la amastigogénesis y tripomastigogénesis extracelular aparentemente no comparten el mismo mecanismo. Se ha reportado que el receptor de IP3 está implicado tanto en el proceso de metaciclogénesis como de amastigogénesis (Hashimoto M y cols., 2014). Por tanto, de acuerdo a nuestros resultados y lo reportado en la literatura pareciera que los diferentes procesos de diferenciación del parásito pueden o no compartir las moléculas participantes.

Además, durante la infección de células en cultivo, iniciadas con epimastigotes, no se sabe si el epimastigote se diferencia directamente a tripomastigote o a amastigote, o si es necesario que el epimastigote se diferencie primero a tripomastigote y este a su vez a amastigote o viceversa. En este sentido, nuestros resultados sugieren que el epimastigote aparentemente es capaz de diferenciarse directamente a amastigote. En apoyo a esta posibilidad, estudios realizados durante la metaciclogénesis de *T. cruzi*, se ha reportado que los epimastigotes presentes en el estómago del triatómino, son capaces de

transformarse a tripomastigotes o a amastigotes, a través de la producción de diferentes formas intermedias, sin que exista evidencia de que para ello sea necesario que pasen primero a amastigotes o tripomastigotes para llegar al estadio contrario (tripomastigote o amastigote, respectivamente) (Kollien AH y Schaub GA, 2000).

Siguiendo con la evaluación de Tc49 durante el proceso de diferenciación del parásito, continuamos analizando el proceso de infección intracelular. Durante la cinética de infección (**Figura 20B**), los parásitos *knock down* mostraron una disminución significativa en el porcentaje de infección a los últimos días (1.6 veces menos a los 12 y 1.28 veces menos a los 14 días post-infección) y no así a los primeros tiempo de infección (6, 8 y 10 días post-infección), aunque si se observó una tendencia a la baja con respecto al control. Esta tendencia, podría ser el resultado del comportamiento promedio de una población de parásitos *knock down*. Por lo tanto, sin duda será necesario realizar experimentos futuros de clonación y análisis de fenotipo de clonas independientes de los parásitos *knock down* de Tc49, de preferencia conteniendo diferentes niveles de disminución del transcrito endógeno, con el fin de observar un efecto de dosis. Esperaríamos entonces, que aquellas clonas con mayor disminución del transcrito de *Tc49* tengan un efecto deletéreo mayor que las que tengan disminuido en menor proporción el nivel de transcrito endógeno blanco y posiblemente, entonces si se pudiera observar el efecto deletéreo desde los primeros tiempos de la cinética de infección.

Los resultados discutidos anteriormente, sugirieron la importancia de Tc49 en algún paso del proceso de infección intracelular de *T. cruzi*. Para evaluar a que nivel del proceso se encontraba tal defecto, evaluamos primero la capacidad de entrada de los parásitos a las 48 horas post-infección, después de infectar por dos horas las células con tripomastigotes liberados de infecciones primarias (**Figura 21**). Esto permite saber la verdadera eficiencia de infección de los parásitos, ya que durante la cinética completa existe una continua liberación de parásitos y consecuente infección de células inicialmente no infectadas. Los resultados

indicaron que no hubo diferencia significativa en el porcentaje de células infectadas con los parásitos *knock down* comparado con los parásitos control (**Figura 21**). Estos resultados nos sugirieron que la disminución de Tc49 no afecta la entrada del parásito, y que por lo tanto el defecto observado se encontraba en otro paso subsecuente.

Continuando con la evaluación, determinamos la diferenciación del tripomastigote hacia amastigote, fenómeno que se lleva a cabo en las primeras 20-24 horas post-infección (Burleigh BA y Andrews NW, 1995; Burleigh BA y Woolsey AM, 2002). Por tanto una manera de evaluar esto, es cuantificando el número de células conteniendo amastigotes versus tripomastigotes. En condiciones normales, se esperaría que a las 48 horas post-infección todas las células infectadas presenten únicamente amastigotes, incluso ya en su proceso de multiplicación. Los resultados obtenidos mostraron que en ningún caso había presencia de tripomastigotes (**Figura 22**) y que únicamente se observaron amastigotes, lo que indica que todos los tripomastigotes se habían diferenciado tanto en los parásitos *knock down* como control. Este resultado sugiere por tanto que Tc49 no participa en la amastigogénesis intracelular de *T. cruzi*.

Sin embargo, al igual que en los resultados de la cinética de infección, se observó una tendencia a la baja en el promedio de número de amastigotes por célula infectada en los parásitos *knock down* respecto a los controles. Por lo tanto, al igual que en la cinética de infección, será necesario analizar clones independientes para confirmar si esta disminución es real. En caso de que así fuera, los resultados podrían sugerir un retardo en la amastigogénesis intracelular y/o en la multiplicación del parásito, así como la participación Tc49 en estos procesos.

Para evaluar la multiplicación activa de amastigotes, cuantificamos el promedio de amastigotes por célula a los 6 y 8 días post-infección. El resultado obtenido mostró que los parásitos *knock down* no presentan diferencia significativa en el promedio de amastigotes por célula respecto a los controles (**Figura 23**). Este

resultado indicó que los amastigotes *knock down* pueden multiplicarse activamente durante el proceso de infección intracelular y sugiere que Tc49 no es importante para la multiplicación de los amastigotes. Cabe mencionar, que nuevamente observamos una tendencia a la baja en los parásitos *knock down*, apoyando nuevamente la necesidad de la obtención y análisis de clonas independientes para verificar estos resultados.

Siguiendo con el análisis del proceso de infección, evaluamos la diferenciación de amastigotes a tripomastigotes, cuantificando el número de tripomastigotes por célula en una cinética de infección (6, 8 y 10 días post-infección). En los resultados obtenidos se observó que no hubo diferencia significativa en el promedio de tripomastigotes por célula en parásitos *knock down* respecto a los controles (**Figura 24**). Sugiriendo que Tc49 no es importante para la diferenciación intracelular de amastigotes a tripomastigotes. Cabe mencionar que la evaluación de este experimento en particular presenta limitantes técnicas, ya que la gran cantidad de parásitos, principalmente al día 10, imposibilita una lectura precisa sobre todo en la forma de tripomastigote. Aun cuando se analizaron las muestras en microscopía confocal a través de los diferentes planos, observamos que es difícil la cuantificación. Nosotros proponemos que en trabajos futuros, sería necesario romper las células infectadas para cuantificar los parásitos. Además, si se realizan estos experimentos con clonas individuales con diferente grado de inhibición de la expresión de *Tc49*, sin duda se podrá tener un mejor resultado.

Por último, para evaluar la salida del parásito al medio extracelular, determinamos el número de parásitos totales liberados durante la cinética de infección a los 6, 8, 10, 12 y 14 días post-infección (**Figura 25A**). El resultado observado mostró que los parásitos *knock down* se liberan en una cantidad constante (0.5×10^6 durante toda la cinética) y en una menor proporción (14.4 veces al día 14) comparado con los parásitos control *mock*, los cuales aumentan en número de 0.5×10^6 hasta 3×10^6 conforme avanza el tiempo (**Figura 25A**). Este resultado sugiere que Tc49 participa en el paso de la liberación de parásitos.

Para poder saber si la disminución de parásitos se debía a una disminución en la salida de tripomastigotes, amastigotes o ambas formas, cuantificamos por separado los diferentes estadios (**Figura 25B y C**). Los resultados obtenidos mostraron que el número de tripomastigotes *knock down* liberados durante toda la cinética de infección fue menor al control *mock*, por ejemplo 11 veces menos a los 10 días y 13.2 veces menos a los 12 días, normalizando a 100% el número de tripomastigotes liberados en el control *mock* (**Figura 25B**). Mientras que, al cuantificar el número de amastigotes *knock down* liberados, no hubo diferencia significativa con respecto al control *mock* (**Figura 25 C**). Este resultado indicó que la forma del parásito que está siendo afectada es únicamente la de tripomastigote. Esto se ve claramente reflejado si cuantificamos el porcentaje de tripomastigotes con respecto a amastigotes, normalizando a 100% el número total de parásitos (**Figura 26**). Observándose que en los parásitos control *mock* el porcentaje de tripomastigotes se mantiene aproximadamente en un rango del 80% al 90%, mientras que en los parásitos *knock down* disminuye progresivamente de un 80% a un 20% con respecto al tiempo.

Una posible explicación a estos resultados, es que al haber una disminución en el número de células infectadas en los parásitos *knock down* (**Figura 20B**), se esperaría observar también una disminución proporcional en el número de parásitos liberados. Sin embargo, dicha proporción no se mantiene ya que por ejemplo mientras la eficiencia de infección disminuye 1.6 veces a los 12 días post-infección, la eficiencia de liberación de los parásitos *knock down* disminuye 13.2 veces al mismo tiempo. Por tanto, esto sugiere que efectivamente existe un defecto en la salida de parásitos *knock down* en particular de la forma de tripomastigote.

Este resultado podría tener dos posibles explicaciones factibles:

- 1) Una posibilidad es que Tc49 es importante para la diferenciación de amastigote hacia tripomastigote. Aun cuando no observamos diferencias en número de tripomastigotes por célula (evaluado morfológicamente tiñendo con DAPI el

núcleo y cinetoplasto), nosotros pensamos que posiblemente el tripomastigote no puede alcanzar su madurez completa y por consecuencia no podría expresar algunas proteínas necesarias para llevar a cabo el proceso de liberación. Desafortunadamente no contamos con marcadores específicos de tripomastigotes y no existen marcadores de formas intermedias, lo que imposibilita el poder evaluar esta posibilidad en este momento. De ser cierta esta posibilidad, nuestros resultados apoyarían que el mecanismo de salida del parásito, que como se dijo anteriormente es desconocido hasta el momento (Espinoza-Gutiérrez B y Manning-Cela RG, 2007), sería un proceso regulado por moléculas del mismo parásito. El hecho de que las células infectadas tanto con los parásitos *knock down* como control, tienen un número de parásitos similar (**Figura 22, 23 y 24**), pero muestran diferencias en la eficiencia de liberación de tripomastigotes, apoya el mecanismo de salida regulada del parásito. Ya que si el mecanismo de salida fuera por ruptura mecánica como consecuencia de la gran cantidad de parásitos dentro de la célula, esperaríamos que el número de parásitos liberados fuera proporcional al número de células infectadas entre los parásitos *knock down* y los controles.

2) La segunda posibilidad es que efectivamente Tc49 participe directa o indirectamente, en el mecanismo de salida del parásito. Aunque consideramos que esta opción es menos probable que la anterior, no podemos descartar del todo esta posibilidad. Por lo que se tendrán que realizar experimentos futuros para evaluarlo.

El experimento directo para evaluar la función de Tc49, sin duda sería un ensayo de amastigogénesis secundaria *in vitro* de los parásitos *knock down* comparado con los controles. Para ello es necesaria la purificación de tripomastigotes, lo que no nos fue posible por la baja cantidad y dificultad en su purificación (**Figura 25B, sección de resultados 9.3.4.2**). Por lo tanto será necesario realizar ensayos futuros con una metodología alternativa, que nos permita obtener y purificar tripomastigotes en suficiente cantidad.

En los experimentos de transformación extracelular de los parásitos *knock down* de Tc49, se observó un defecto en la transformación de epimastigotes hacia

amastigotes. En la literatura se ha reportado que una proteína puede participar en más de un proceso de diferenciación de *T. cruzi* (Hashimoto M y cols., 2014). Por lo que consideramos importante evaluar si Tc49 participa en otro proceso de diferenciación del parásito, como lo es la metacicloogénesis. Ensayos *in vitro*, incubando epimastigotes *knock down* de Tc49 y control *mock* en medio artificial de orina de triatómino, que se sabe detona la diferenciación de epimastigotes hacia tripomastigotes metacíclicos (Contreras VT y cols., 1988) mostró que Tc49 no participa en la metacicloogénesis de *T. cruzi*. Sin embargo, al igual que lo observado para los ensayos de multiplicación de amastigotes (**Figura 22 y 23**) y de número de tripomastigotes por célula al día 10 post-infección (**Figura 24**), también se observó una tendencia a la baja en la metacicloogénesis de los parásitos *knock down*. Por lo que será necesario realizar experimentos, con clones individuales con diferente grado de inhibición del nivel del ARNm de Tc49, para determinar con mayor certeza si Tc49 participa o no en la metacicloogénesis del parásito.

Ya que determinamos que Tc49 aparentemente está participando en la diferenciación extracelular de epimastigote hacia amastigote, así como en la salida del parásito; era necesario indagar más con respecto a las características de la secuencia en estudio, para dilucidar el posible mecanismo que utiliza para llevar a cabo dichas funciones. Realizamos entonces un análisis *in silico* más profundo, cuyo resultado mostró que *Tc49* no presenta dominios ni secuencias conservadas y que tiene ortólogos en otros tripanosomátidos, en donde también están anotados como secuencias hipotéticas (**Tabla 1**). Interesante el ortólogo de Tc49 en *T. brucei*, anotado con número de acceso Tb927.4.1910, se expresa diferencialmente durante el proceso de transformación de estadio del parásito (**Figura 8**). Aunque, no se ha demostrado experimentalmente su participación en la transformación de *T. brucei*, los datos sugieren que pudiera ser importante en dicho proceso. En apoyo a lo anterior, datos de expresión del gen de Tb927.4.1910 en la forma prociclica de *T. brucei*, muestran que es regulado a la baja cuando la proteína de unión a ARN TbDRBD3 está ausente (**Figura 9**). Se ha demostrado que TbDRBD3 regula un subgrupo específico de transcritos en *T. brucei*, mediante su unión a motivos ricos

en AU presentes en la región UTR-3' de un grupo de transcritos blanco relacionados funcionalmente (Estévez AM, 2008). Al realizar la búsqueda de motivos ricos en AU en la región UTR-3' del transcrito de Tc49, encontramos que tiene un motivo de este tipo (**Figura 10**). Además, que localizamos el ortólogo de TbDRBD3 en *T. cruzi*, el cual está anotado como DRBD3 putativo (TcCLB.506649.80). En este sentido, los datos encontrados en el análisis *in silico*, abren la posibilidad de que el posible mecanismo por el cual Tc49 pudiera ser regulado, fuera a nivel de estabilidad del ARNm a través de la unión de DRBD3 en su región UTR-3'. Si esto fuera cierto, este resultado nos estaría dando la pauta no solo de conocer el posible mecanismo por el cual Tc49 está participando en el proceso de diferenciación de *T. cruzi*; si no también, el poder identificar el grupo de transcritos relacionados funcionalmente para llevar a cabo la diferenciación del parásito a través de la regulación de DRBD3 putativa.

11. Resumen de resultados

- 11.1. Se comprobó la expresión diferencial de nueve clonas de la biblioteca de substracción de la forma intermedia respecto a tripomastigote de *T. cruzi*.
- 11.2. Tc49 participa en el proceso de diferenciación de epimastigote hacia amastigote, durante la transformación extracelular de *T. cruzi*.
- 11.3. Tc49 es importante para que se lleve a cabo el proceso de infección intracelular completo de *T. cruzi*.
- 11.4. La proteína Tc49 tiene un papel en el proceso de salida del parásito de la célula infectada.
- 11.5. Tc49 aparentemente no participa en el proceso de metaciclogénesis de *T. cruzi*.

12. Conclusiones

Tc49 participa en la amastigogénesis extracelular y salida de *T. cruzi* de células infectadas.

13. Perspectivas

- 13.1. Evaluar la expresión de la proteína Tc49 en epimastigotes, tripomastigotes, FI y amastigotes *knock down* de *T. cruzi*.
- 13.2. Obtener y caracterizar clonas de la población de parásitos *knock down* de Tc49, con diferente grado de inhibición de la expresión del ARN mensajero endógeno, esperando observar un efecto de dosis en el análisis de su fenotipo.
- 13.3. Evaluar la localización celular de Tc49 en *T. cruzi*.
- 13.4. Evaluar la posible unión de DRBD3 putativa a la región UTR-3' de *Tc49* y de su posible participación en el mecanismo por el cual Tc49 participa en la diferenciación de *T. cruzi*, mediante ensayos de *RNA pull down* y/o *Northwestern blot*.
- 13.5. En caso de que DRBD3 se una a la región UTR-3' de *Tc49*, realizar experimentos de *RIP Chip* para identificar el posible grupo de transcritos, que pudieran ser regulados durante el proceso de diferenciación de *T. cruzi* a través de DRBD3.

14. Referencias

Allaoui A, François C, Zemzoumi K, Guilvard E, Ouaiissi A, 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.

Andrade Z, 1999. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 94: 71-80.

Andrews NW, 1993. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. *Biol. Res;* 26: 65-67.

Andrews NW, and Whitlow MB 1989. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol Biochem Parasitol.* 3:249-256.

Andrews NW, C. K. Abrams, S. L. Slatin, and G. Griffiths 1990. A *T. cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* 61:1277-1287.

Andrews NW, Hong K, Robbins ES, Nussenzweig V. 1987. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol;* 64: 474-484.

Aranda-Fraustro A, Chávez-Rentería B, Martha, Ballinas-Verdugo MA, Arce-Fonseca

Araya JE, Cornejo A, Orrego PR, Cordero EM, Cortéz M, Olivares H, Neira I, Sagua H, da Silveira JF, Yoshida N, González J, 2008. Calcineurin B of the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is involved in cell invasion. *Microbes Infect.* 10(8):892-900.

Ayub MJ, Atwood J, Nuccio A, Tarleton R, Levin MJ. 2009. Proteomic analysis of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 382(1):30-4.

Baptista CS, Vêncio RZ, Abdala S, Valadares MP, Martins C, de Bragança Pereira CA, Zingales B, 2004. DNA microarrays for comparative genomics and analysis of gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 138:183-194.

Bonney KM and Engman DM, 2008 "Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?", *Curr Mol Med,* 8, 6, 510-518.

Brandariz S, Schijman A, Vigliano C, Arteman P, Viotti R, Beldjord C, Levin MJ 1995. Detection of parasite DNA in Chagas' heart disease. *Lancet*; 346: 1370-1371.

Brener Z, 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*; 27: 347-382.

Brener Z, 1987. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82: 205-212.

Burleigh BA and Andrews NW, 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*; 49:175-200

Burleigh BA and Woolsey AM, 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* Invasion. *Cellular Microbiology*; 4(11): 701–711.

Buscaglia CA, Di Noia JM, 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect*; 5:419-27.

Cardoso J, Lima CDP, Leal T, Gradia DF, Fragoso SP, et al. 2011. Analysis of Proteasomal Proteolysis during the In Vitro Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi*. PLoS ONE 6(6): e21027.

Cardoso J, Soares MJ, Menna-Barreto RFS, Bloas RL, Sotomaior V, Goldenberg S, Krieger MA, 2008. Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metaciclogénesis. *Parasitol Res.* 103:941–951. DOI 10.1007/s00436-008-1081-6.

Carrada-Bravo T, 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Mex Patol Clin*; 51(4): 205-219.

Carvalho TU y De Souza W, 1986. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo; 28, 205.

Chagas C, 1909. Nova tripanosomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1: 159-218.

Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles Mde N, Goldenberg S, 1988. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 83(1):123-33.

Coura JR, 2007. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(Suppl. I):113-122.

Coura JR, Dias JCP, 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 104: 31-40.

Cruz-Reyes A and Pickering-López J, 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years-A review. *Memories of Institute Oswaldo Cruz*. 101(4): 345-354.

Da Silva MCF and Silva AE, 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad. Saúde Pública*; 23(10): 2263-2274

De Lima AR, Navarro MC, Arteaga RY, Contreras VT, 2008. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in low glucose axenic media shifts its competence to differentiate at metacyclic tripomastigotes. *Experimental Parasitology* 119:336–342.

De Souza W, 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*; 8: 269-285.

Duschak VG, Barbosa M., Garcia GA., Lammel EM., Couto AS., Isola DL. 2006. Novel cysteine proteinase in *trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitology*. 132:345-55.

Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RFS, Santos ALS, Branquinha MH, d’Avila-Levy CM, 2011. MDL28170, a Calpain Inhibitor, Affects *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis, Ultrastructure and Attachment to *Rhodnius prolixus* Midgut. *PLoS ONE* 6(4): e18371.

Espinoza-Gutiérrez B y Manning-Cela RG, 2007. An overview of mammalian cell infection by *Trypanosoma cruzi*: Cellular and molecular basis. *Res Signpost*, 291-311.

Estévez AM, 2008. The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*; 36(14):4573-86.

Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ, 2000. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol*. 86(6):1213-8.

Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA, 2002. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Arch Med Res*; 33: 362-370.

Guzmán C, Garcia L, Verdugo J, Guerrero S, Torres M, Ramirez C, 1998. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev Panam Salud Publica*; 4(2): 94-99. ISSN 1020-4989.

Guzmán-Bracho C, 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in parasitology*. 17: 372-376.

Hashimoto M, Nara T, Hirawake H, Morales J, Enomoto M and Mikoshiba K, 2014. Antisense Oligonucleotides Targeting Parasite Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Inhibits Mammalian Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Scientific Reports*; 4:4231

Hernández-Osorio LA, Márquez-Dueñas C, Florencio-Martínez LE, Ballesteros-Rodea G, Martínez-Calvillo S and Manning-Cela RG, 2010. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. *J Biomed Biotechnol*. ID:283842.

Herrera EM, Ming M, Ortega-Barria E, Pereira ME, 1994. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparin sulphate on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*; 65:73-83.

Higuchi ML, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F, 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*; 2: 101-105.

Hoare CA and Wallace FG, 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. *Nature*; 212: 1385-1386.

Jones EM, Colley DJ, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, 1993. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg*; 48: 348-357.

Juliano RL, Dixit VR, Kang H, Kim TY, Miyamoto Y, Xu D, 2005. Epigenetic manipulation of gene expression: a toolkit for cell biologists. *J Cell Biol.* 169(6): 847-857.

Kahn S, Wleklinski M, Aruffo A, Farr A, Coder D, Kahn M, 1995. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med.* 182: 1243-1258.

Kalil J and Cunha-Neto E, 1996. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today*; 12: 396-399.

Kimura E, Lay W, Fernandez J. 1978. Extracellular *in vitro* evolution of metacyclic trypomastigotes isolated from *trypanosoma cruzi* culture. *Rev Uinst Med Trop Sao Paulo* 20:133-138.

Kollien AH and Schaub GA, 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today.* 16(9):381-7.

Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V, 1990. *J Exp Med*; 168, 649.

M, Medrano-Castro GA, De Micheli-Serra A, 2007. Cotejo electro-histológico en un caso de miocardiopatía chagásica crónica. *Arch. Cardiol. Méx.* vol.77, n.3, pp. 249-252.

Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ, 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(1): 1-12.

Málaga S and Yoshida N, 2001. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun.* 69(1):353-9.

Manning-Cela R, Cortes A, Gonzalez-Rey E, Van Voorhis WC, Swindle J, Gonzalez A, 2001. LYT1 protein is required for efficient *in vitro* infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*; 69: 3916-3923.

Militello KT and Refour P, et al, 2008. Antisense RNA and RNAi in protozoan parasites: working hard or hardly working?. *Mol Biochem Parasitol.* 157(2): 117-126.

Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGrawc RA, Tarleton RL, 2003. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 131:55–64

Mutomba MC and Wang CC, 1998. The role of proteolysis during differentiation of *Trypanosoma brucei* from the bloodstream to the procyclic form. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 93:11–22.

Navarro MC, De Lima AR, Askue J, Contreras VT, 2003. Morphological Comparison of Axenic Amastigogenesis of Trypomastigotes and Metacyclic Forms of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(1): 83-91.

Okura M, Fang J, Salto ML, Singer RS, Docampo R, Moreno SN. 2005. A lipid-modified phosphoinositide-specific phospholipase C (TcPI-PLC) is involved in differentiation of trypomastigotes to amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 280(16):16235-43.

Prata A, 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*; 1:92-100.

Qi Z and Mi R, 2016. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase in vivo and in vitro for retroviral vector-based antisense oligonucleotide therapy in ovarian cancer. *Cancer Gene Ther*. 23(1):36-42.

Rodríguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A, Andrews NW, 1996. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J. Cell Biol*; 134: 349-62.

Rodríguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW, 1997. Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell Biol*. 137: 93-104.

Rondinelli E, Silva R, Carvalho JF, de Almeida Soares CM, de Carvalho EF, de Castro FT. 1988 Aug;66(2):197-204. *Trypanosoma cruzi*: an in vitro cycle of cell differentiation in axenic culture. *Exp Parasitol*.

Sambrook J and Rusell D, 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New-York USA.

Sangenito LS, Gonçalves KC, Abi-chacra EA, Sodr  CL, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS, 2011. Multiple effects of pepstatin A on *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Parasitol Res.* DOI 10.1007/s00436-011-2796-3.

Schmunis GA, 1987. Autoimmunity in Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 82: 287-310.

Schmunis GA, 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion.* 31: 547-557.

Schmunis GA, 1999. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 94: 93–101.

Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL, 2009. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 104: 167-180.

Tarleton RL, 2003. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol.* 19: 447-451.

Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR, 2006. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 101(5): 463-491.

Teixeira ARL, Teixeira ML, Santos-Buch CA, 1975. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am J Pathol*; 80: 163-180.

Tonelli RR, Augusto LdS, Castilho BA, Schenkman S, 2011. Protein Synthesis Attenuation by Phosphorylation of eIF2a Is Required for the Differentiation of *Trypanosoma cruzi* into Infective Forms. *PLoS ONE* 6(11): e27904.

Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W and Alves MJM, 2004. L-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cellular Microbiology.* 6(8), 733–741.

Tovar J and Fairlamb AH, 1996. Extrachromosomal, homologous expression of trypanothione reductase and its complementary mRNA in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* 24(15):2942-9.

Tyler KM, Engman DM, 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J for Parasitol*; 31: 472-481.

Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T, 2004. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 6(6): 509-519.

Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DA, Correa-Oliveira R, 1996. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic Chagas disease. *Lancet*; 348: 891-892.

Vazquez MP and Levin M, 1999. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene*; 239: 217-225.

Vickerman K, 1974. The ultrastructure of pathogenic flagellates. In: Ciba Foundation Symposium 20. Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. *Amsterdam: Elsevier*; 171-198.

Vieira da Silva C, Luquetti AO, Rassi A, Mortara RA, 2006. Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Microbes and Infection*; 8: 2120-2129.

Zeledon R, Alvarenga NJ, Schosinsky K, 1997. In "Chagas Disease". Pan American Health Organization; Publ No. 347. pp 59.