



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

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Caracterización molecular de *TcRBP-like* de *T. cruzi*”

T E S I S

Que presenta

DXINEGUEELA YOLANDA ZANATTA GARCÍA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directora de la Tesis

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

Ciudad de México

Julio de 2017

Asesores:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Profesores del Departamento de Biomedicina Molecular del
CINVESTAV-IPN

Dr. Santiago Martínez Calvillo

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



Este estudio se realizó en el departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rebeca G. Manning Cela.

Durante el desarrollo de este trabajo la sustentante fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rebeca Manning por su apoyo, paciencia y enseñanzas.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, al Dr. Marco Antonio Meraz Ríos y al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, por su asesoría, sugerencias y revisión de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio, Claudia, Maggie, Anais, Tere, Viruss y don Pedro, que además de ser mis amigos me han ayudado con sus buenos consejos y me han compartido muy gratos momentos.

DEDICATORIAS

A mi madre, Yolanda García, porque eres para mí la guerrera más valiente y mi inspiración para seguir luchando cada día. Y porque siempre me permites soñar sin límites, apoyando mis decisiones.

A mi padre, Jaime Zanatta, mi ángel de la guarda y quien logra lo que nadie, darme lecciones de vida, aún ausente. Soy lo que me enseñaste.

A mis hermanas, Biaany y Nisa, que me apoyan en todo y con quienes paso momentos inolvidables. Además de que siempre me dan ánimos y me contagian de su alegría. Para ustedes no hay imposibles.

A mis sobrinos Leonardo y Lorenzo, por ser motivos de superación para su tía y porque cuando estoy con ustedes, se me olvida el mundo y me divierto mucho.

A Mario Aguilar, por su amor y por ser un hogar cálido para mí, porque haces que todos los esfuerzos valgan la pena. Y porque eres mi compañero de aventuras.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	V
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
I. ANTECEDENTES GENERALES	1
1.1. Enfermedad de Chagas	1
1.1.1. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas	2
1.1.2. Cuadro clínico de la enfermedad de Chagas	3
1.1.3. Epidemiología de la enfermedad de Chagas	4
1.1.3.1. Distribución geográfica y frecuencia mundial	4
1.2. <i>T. cruzi</i>	5
1.2.1. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	6
1.2.2. Genoma de <i>T. cruzi</i>	8
1.2.2.1. Diversidad genética de <i>T. cruzi</i>	9
1.2.2.2. Organización del genoma nuclear de <i>T. cruzi</i>	10
1.2.2.3. Transcripción policistrónica en <i>T. cruzi</i>	11
II. ANTECEDENTES DIRECTOS	13
2.1. Proteínas de unión al ARN	13
2.1.1. Participación de RBPs, en la regulación del proceso de diferenciación e infección en tripanosomátidos	20
III. RESULTADOS PREVIOS	22
3.1. Resumen de resultados de la expresión diferencial de NM1-cl1 y CI2-cl2	23

IV.	JUSTIFICACIÓN	24
V.	HIPÓTESIS	24
VI.	OBJETIVOS	25
	6.1. Objetivo general	25
	6.2. Objetivos particulares	25
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
VIII.	RESULTADOS	40
IX.	DISCUSIÓN	60
X.	CONCLUSIONES	66
XI.	PERSPECTIVAS	66
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Principales especies de triatomínos vectores de <i>T. cruzi</i> en América Latina.	2
Figura 2	Signos clínicos de la fase aguda y la fase crónica de la enfermedad de Chagas.	4
Figura 3	Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.	5
Figura 4	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .	7
Figura 5	Transcripción policistrónica y procesamiento del ARNm en tripanosomátidos.	13
Figura 6	Estructura de los dominios proteicos de unión al ARN.	18
Figura 7	Motivo RRM en <i>TcRBP-like</i> de <i>T. cruzi</i> .	44
Figura 8	Secuencia de aminoácidos del motivo RRM en <i>TcRBP-like</i> de <i>T. cruzi</i> .	44
Figura 9	Alineamiento del motivo de reconocimiento de ARN (RRM) en diversos organismos.	45
Figura 10	Estructura secundaria probable de <i>TcRBP-like</i> de <i>T. cruzi</i> .	46
Figura 11	Estructura tridimensional probable de <i>TcRBP-like</i> de <i>T. cruzi</i> .	48
Figura 12	Búsqueda de señales de localización nuclear en <i>TcRBP-like</i> de <i>T. cruzi</i> .	49
Figura 13	Identificación de la expresión de las proteínas recombinantes de <i>TcRBP-like</i> por Western blot.	52
Figura 14	Purificación de las proteínas recombinantes de <i>TcRBP-like</i> .	53
Figura 15	ARN total de epimastigotes NM1-cl1 de <i>T. cruzi</i> , con un estímulo de infección.	55
Figura 16	ARN <i>pull-down</i> con His- <i>TcRBP-like</i> y ARN total de epimastigotes NM1-cl1 de <i>T. cruzi</i> .	56

Figura 17	ADNs de colonias obtenidas en la clonación del ADNdc, en el vector pGEM-T Easy.	58
Figura 18	Digestión de ADNs de colonias obtenidas en la clonación del ADNdc.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Proteínas de unión al ARN, identificadas en los tres tripanosomátidos más estudiados.	18
Tabla 2	Oligonucleótidos utilizados para amplificar a <i>TcRBP-like</i> .	29
Tabla 3	Ortólogos de <i>TcRBP-like</i> en tripanosomátidos.	41
Tabla 4	Similitud de TCSYLVIO_006186 con transcritos de proteínas de <i>Homo sapiens</i> y <i>Drosophila melanogaster</i> .	43
Tabla 5	Modificaciones post-traduccionales putativas de <i>TcRBP-like</i> de <i>T. cruzi</i> .	50
Tabla 6	ARNm(s) unidos a <i>TcRBP-like</i> en ensayos de ARN <i>pull-down</i> .	59

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNdc	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena.
ADNcs	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla.
ALBA	Dominio de unión al ARN (por sus siglas en inglés, <i>Acetylation Lowers Binding Affinity</i>).
APP	Proteína precursora de amiloide (por sus siglas en inglés, <i>Amyloid Precursor Protein</i>).
ARM	Motivo rico en arginina (por sus siglas en inglés, <i>Arginine-Rich Motif</i>).
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal.
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia.
b	Bases.
BREs	Elementos de respuesta a Bruno (por sus siglas en inglés, <i>Bruno Response Elements</i>).
CCCH	Dedos de zinc (Cisteína-Cisteína-Cisteína-Histidina).
CCHC	Dedos de zinc (Cisteína-Cisteína-Histidina-Cisteína).
CDS	Secuencia de ADN codificante (por sus siglas en inglés, <i>Coding DNA Sequence</i>).
CSD	Dominio CSD (por sus siglas en inglés, <i>Cold Shock Domain</i>).
CUGBP1	Proteína de unión a CUG (por sus siglas en inglés, <i>CUG-Binding Protein 1</i>).
DEPC	Dietilpirocarbonato.
DMEM	Medio mínimo modificado de Dulbecco (por sus siglas en inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>).
DMPK	Proteína cinasa de la distrofia miotónica (por sus siglas en inglés, <i>Dystrophia Myotonica Protein Kinase</i>).
DTU	Unidad de Tipificación Discreta (por sus siglas en inglés, <i>Discrete Typing Unit</i>).
G	Gravedades.
gp63	Glicoproteína 63.
GSH	Glutación.
GST	Glutación S-transferasa.
His	Histidinas.
IPTG	Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranósido.
Kb	Kilobases.

KDa	Kilodalton.
KH	Motivo KH (por sus siglas en inglés, <i>K Homology</i>).
LIT	Infusión de hígado y triptosa (por sus siglas en inglés, <i>Liver Infusion Tryptose</i>).
MASP	Proteína de superficie asociada a mucina (por sus siglas en inglés, <i>Mucin-Associated Surface Protein</i>).
ME	Miniexón.
min	Minutos.
Mpb	Mega pares de bases.
Ni	Níquel.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
ORF	Marco abierto de lectura (por sus siglas en inglés, <i>Open Reading Frame</i>).
PABP1	Proteína de unión a poli(A) 1 (por sus siglas en inglés, <i>Poly(A)-Binding Protein 1</i>).
pb	Pares de bases.
PBS	Tampón fosfato salino (por sus siglas en inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PTU	Unidad de Transcripción Policistronica (por sus siglas en inglés, <i>Policistronic Transcription Unit</i>).
RBD	Dominio de unión al ARN (por sus siglas en inglés, <i>RNA-Binding Domain</i>).
RBP	Proteína de unión al ARN (por sus siglas en inglés, <i>RNA-Binding Protein</i>).
RGG	Arginina-Glicina-Glicina.
RNA-seq	Secuenciación de ARN (por sus siglas en inglés, <i>Ribonucleic Acid-sequencing</i>).
rpm	Revoluciones por minuto.
RRM	Motivo de reconocimiento de ARN (por sus siglas en inglés, <i>RNA-Recognition Motif</i>).
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (por sus siglas en inglés, <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>).
s	Segundos.
SFB	Suero Fetal Bovino.
SL	Mini exón (por sus siglas en inglés, <i>Splice Leader</i>).

SNP	Polimorfismo de nucleótido único (por sus siglas en inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>).
SSR	Región de cambio de hebra (por sus siglas en inglés, <i>Strand Switch Region</i>).
TA	Temperatura ambiente.
TBE	Tris-Borato-EDTA.
TcI	<i>Trypanosoma cruzi</i> I.
TcII	<i>Trypanosoma cruzi</i> II.
TcIII	<i>Trypanosoma cruzi</i> III.
TcIV	<i>Trypanosoma cruzi</i> IV.
TcV	<i>Trypanosoma cruzi</i> V.
TcVI	<i>Trypanosoma cruzi</i> VI.
TE	Tris-EDTA.
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México.
UTR	Región no traducida (por sus siglas en inglés, <i>Untranslated Region</i>).
V	Volts.
VSG	Glicoproteína variable de superficie (por sus siglas en inglés, <i>Variable Surface Glycoprotein</i>).
WTSS	Secuenciación completa del transcriptoma (por sus siglas en inglés, <i>Whole Transcriptome Shotgun Sequencing</i>).

RESUMEN

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Dicho parásito lleva a cabo un ciclo intracelular como parte del proceso de infección que da origen a la fisiopatogenia de la enfermedad. Para que esto suceda es determinante que *T. cruzi* exprese genes estadio-específicos que codifican proteínas que participan en las diferentes etapas de unión, internalización, diferenciación, multiplicación y salida del parásito de la célula hospedera, lo que a su vez requiere de una regulación genética muy precisa. A este respecto, se sabe, que los tripanosomátidos controlan su expresión genética a nivel post-transcripcional, como consecuencia de la naturaleza policistrónica de sus genes. Esto lo pueden hacer, regulando la eficiencia de *trans-splicing* y poliadenilación, y con el uso de RBPs. Las RBPs actúan como moduladores de la estabilidad de los ARNm(s). En *T. brucei*, se ha observado que hay RBPs que pueden regular a un grupo de transcritos relacionados funcionalmente, participando así en fenotipos específicos, como la infectividad del parásito. A pesar de la importancia que tienen estas RBPs en la regulación de la expresión genética en tripanosomátidos, son pocas las que han sido caracterizadas en *T. cruzi*. En este trabajo evaluamos si *TcRBP-like* de *T. cruzi*, es una RBP. Esta secuencia esta anotada como una RBP putativa del parásito la cual identificamos en un trabajo previo que se expresa tanto a nivel de transcrito como de proteína de manera diferencial en dos clonas con diferente grado de infectividad (NM1-cl1/alta infectiva y C12-cl2/baja infectiva). Con la finalidad de determinar si *TcRBP-like* es una RBP, se llevaron a cabo análisis *in silico* de su secuencia y ensayos de ARN *pull-down*. El análisis de secuencia mostró que *TcRBP-like* posee un motivo RRM de unión al ARN, sugiriendo que es una RBP. En los ensayos de ARN *pull-down* mostramos que la proteína recombinante His-*TcRBP-like* interacciona con diversos ARNm(s) del parásito en un rango de tamaño de 400 a 5000 b. La identificación de una alícuota de estos transcritos unidos, indicó que His-*TcRBP-like* interacciona con el ARNm

de la histona H1, y de las proteínas ribosomales S7 y L37. Estos resultados en conjunto indican que *TcRBP-like* es una RBP de *T. cruzi*.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas' disease. This parasite carries out an intracellular cycle as part of its infection process, which results in the development of the pathophysiology of the disease. For this purpose, *T. cruzi* needs to express stage-specific genes that encode proteins that participate in the binding, internalization, differentiation, multiplication and exit of the parasites from the target cell, events that require of a precise gene regulation. It is well known that the vast majority of gene expression in trypanosomatids is at post-transcriptional level, regulating the efficiency of mRNA trans-splicing and polyadenylation and by the participation of RBPs. These proteins can modulate the stability and the translation efficiency of parasite transcripts, and in *T. brucei* it has been reported that some of them can regulate a group of mRNA functionally related, participating in specific phenotypes, such as the parasite infectivity. Despite their importance in the regulation of gene expression in trypanosomatids, few RBPs have been characterized in *T. cruzi*. In this work we evaluated if *T. cruzi* *TcRBP-like* is an RBP. This sequence is annotated as a putative RBP, and it was identified in a previous work because it is differentially expressed at both transcript and protein levels in two parasite clones with different levels of infectivity (NM1-cl1 / high infective and CI2-cl2 / low infective). In order to determine whether *TcRBP-like* correspond to an RBP, *in silico* analysis of its sequence and RNA pull-down assays were carried out. The sequence analysis showed that *TcRBP-like* has a RRM motif of RNA binding, suggesting that this is an RBP. The RNA pull-down assays showed that the His-*TcRBP-like* recombinant protein interacts with several parasite mRNA (s) with a size range of 400 to 5000 b. The identification of an aliquot of these transcripts indicated His-*TcRBP-like* interacts with the mRNAs that encode for histone H1, and ribosomal proteins S7 and L37. These results together indicate that *TcRBP-like* correspond to an RBP of *T. cruzi*.

I. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una infección crónica y sistémica potencialmente mortal, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Rassi et al., 2010). Dicho agente etiológico fue aislado por el médico e investigador brasileño Carlos Chagas en 1909, a partir de un insecto vector infectado y posteriormente de un infante infectado. Chagas también, describió el cuadro clínico del trastorno denominado en su honor, así como sus vectores de transmisión y reservorios (Chagas, 1909; Teixeira et al., 2011; Teixeira et al., 2006).

En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta a esta enfermedad como una de las 17 principales enfermedades tropicales desatendidas (Tarleton et al., 2014). Estos padecimientos suelen afectar principalmente a individuos que habitan ambientes empobrecidos, en lugares con climas calurosos y húmedos y que hasta el momento no han recibido suficiente atención por parte de gobiernos e instituciones sanitarias, ya que generan altos costos de diagnóstico, tratamiento y control (OMS, 2010; OMS, 2016).

Uno de los mayores inconvenientes de la enfermedad de Chagas es que hasta el momento no cuenta con un tratamiento efectivo. Existen dos medicamentos que se usan para tratar la infección: el Benznidazol y el Nifurtimox, los cuales son parcialmente eficaces durante la fase aguda de la enfermedad pero no en su fase crónica, por lo que es importante hacer un diagnóstico temprano. Aunado a ello, ambos fármacos pueden tener efectos adversos muy severos, siendo necesario realizar el tratamiento bajo supervisión médica.

1.1.1. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas

El principal mecanismo por el que se contrae la enfermedad, es vectorial, debido al contacto con las heces de insectos triatominos previamente infectados, también conocidos como chinches (**Figura 1**) (Bern et al., 2011). Aproximadamente 70 % de los casos clínicos se deben a este mecanismo, siendo el más acontecido en países endémicos para la enfermedad de Chagas. Sin embargo, en mucho menor proporción, la infección también se puede adquirir de otras maneras:

- Por transfusiones de sangre o trasplantes de órganos, procedentes de donadores infectados (aproximadamente 20 % de los casos clínicos, resultando el mecanismo de transmisión más común en países no endémicos).
- Por vía congénita, de la madre infectada a su hijo durante el embarazo y/o el parto (0.5 al 10 % de los casos clínicos).
- Por vía oral, al consumir alimentos contaminados con *T. cruzi* (menos del 1 % de los casos clínicos).
- Por accidentes de laboratorio, en el personal que estudia a la enfermedad de Chagas y a su agente causal (menos del 1 % de los casos clínicos) (Carabarin-Lima et al., 2013).

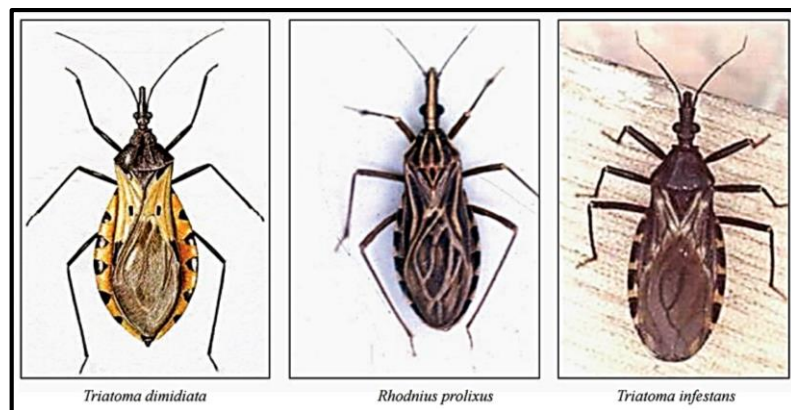


Figura 1. Principales especies de triatominos vectores de *T. cruzi* en América Latina. Triatoma dimidiata, Rhodnius prolixus y Triatoma infestans. Tomada de Guhl, 2009.

1.1.2. Cuadro clínico de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar dos fases, una aguda y una crónica.

Luego de la inoculación del parásito, hay un periodo de incubación de entre una y dos semanas, que se continúa con la fase aguda con una duración de 6 a 8 semanas (Montgomery et al., 2014). En esta fase hay presencia de parásitos en la sangre de los pacientes (**Figura 2a**), pero la infección puede no percibirse ya que en el 95% de los casos es una fase asintomática, además de que el título de anticuerpos de los infectados puede ser insuficiente para su detección. En algunos pacientes (menos del 5% de los casos) se desarrollan signos típicos, denominados en conjunto, “puerta de entrada”. Estos pueden ser el chagoma de inoculación, que es un nódulo subcutáneo con adenitis en el sitio de la picadura; o el llamado signo de Romaña cuando la entrada del parásito se lleva a cabo en la conjuntiva ocular (Bern et al., 2011). En los pocos casos sintomáticos puede haber fiebre, malestar general, dolor muscular y articular, somnolencia, calambres, diarrea, edema y cianosis, síntomas que pueden resultar confusos y no permiten relacionarlo directamente con el contacto con el parásito. La muerte en esta fase (menos del 1 al 2% de los casos con síntomas) puede ser causada por miocarditis o meningoencefalitis con algunas complicaciones como bronconeumonía (Teixeira et al., 2006).

La fase crónica que prosigue a la aguda, se divide en dos etapas, la etapa latente, indeterminada o asintomática y la etapa clínica. Alrededor del 70% de los pacientes permanecen en la etapa asintomática por el resto de sus vidas (Canepa, 2010. Tesis Doctoral). El 30% restante evoluciona a la etapa clínica, luego de 15 o 20 años de haber contraído la infección. En esta etapa, los niveles de parasitemia disminuyen y se vuelven indetectables en el microscopio (Bern et al., 2011). Se presenta insuficiencia cardíaca, y arritmias asociadas a muertes inesperadas. También hay pacientes que muestran compromiso visceral irreversible, como los megasíndromes digestivos (megaesófago y megacolon) (**Figura 2b, c, d, e**) (Teixeira et al., 2006).

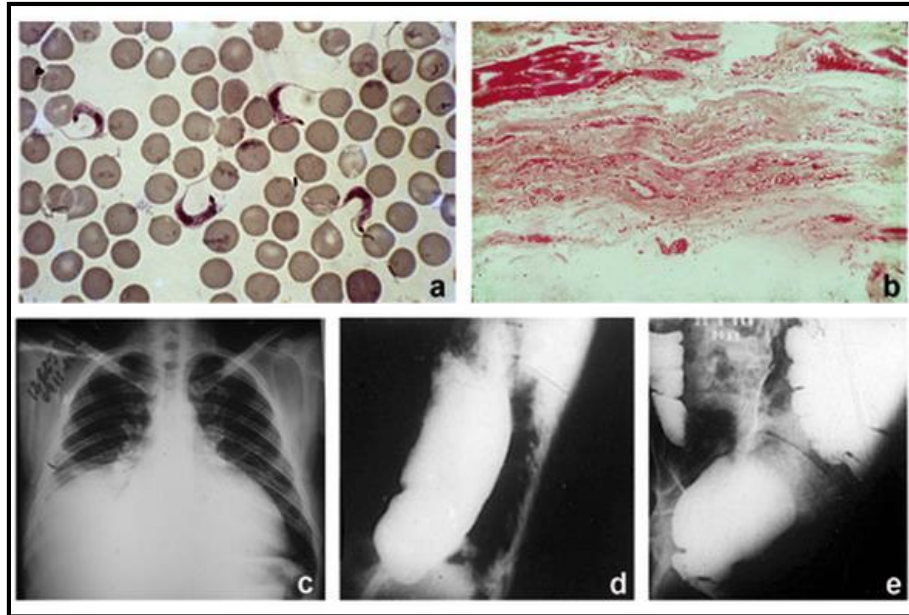


Figura 2. Signos clínicos de la fase aguda y la fase crónica de la enfermedad de Chagas. a) *T. cruzi* en la sangre de un individuo infectado durante la fase aguda. b) Cicatriz en el tejido cardiaco durante la fase crónica. c) Dilatación cardiaca en la fase crónica. d) Megaesófago en la fase crónica. e) Megacolon en la fase crónica. Tomada de Coura and Vinas, 2010.

1.1.3. Epidemiología de la enfermedad de Chagas

1.1.3.1. Distribución geográfica y frecuencia mundial

En el mundo, se estima que más de 13 millones de personas padecen actualmente la enfermedad de Chagas en sus diferentes fases, pero la mayoría de ellos lo desconoce (Magalhães et al., 2015). Aunado a esto, hay 100 millones de personas en riesgo de infectarse y se reportan aproximadamente 12,000 muertes anuales a causa de este padecimiento (Montgomery et al., 2014).

Actualmente, en América Latina, hay 21 países que se consideran endémicos para la enfermedad de Chagas (Organización Panamericana de la Salud, OPS, 2014). No obstante, la infección no es única de América Latina, ya que se ha incrementado su incidencia en países como Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y varias naciones europeas, debido a la migración

de individuos infectados (**Figura 3**). A pesar de este inconveniente, en las últimas décadas se han llevado a cabo algunos programas exitosos de control de vectores, que han disminuido la transmisión de la infección en las zonas rurales mayormente afectadas (Bern et al., 2011).

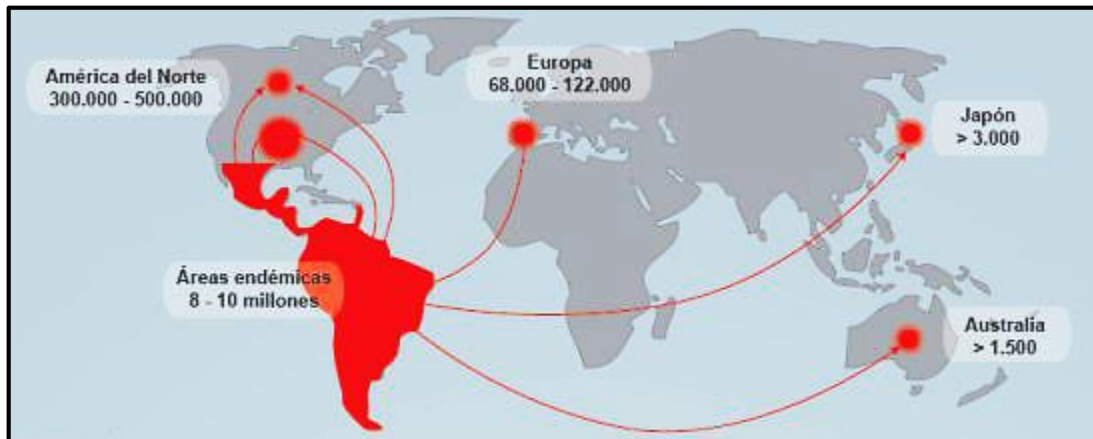


Figura 3. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. La enfermedad de Chagas es una zoonosis endémica en 21 países latinoamericanos (mostrados en color rojo), donde se estiman aproximadamente 8-10 millones de casos clínicos. En el mapa se observan las rutas de migración que siguen los individuos infectados desde América Latina hacia países no endémicos como Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y algunos países europeos (líneas, flechas y puntos en rojo), resultando así, en la propagación de la enfermedad. También se muestra una estimación del número total de personas infectadas en las naciones no endémicas. Tomada de Coalición Chagas, 2015.

1.2. *T. cruzi*

T. cruzi es un protozooario del orden *Kinetoplastida*, nombrado así por tener una estructura llamada cinetoplasto localizada dentro del mitocondrion celular (Zago et al., 2016). Según su morfología, los kinetoplastidos eucariontes se dividen en dos subórdenes principales, los uniflagelados tripanosomátidos y los biflagelados bodonina. *Trypanosomatidae* es una familia que incluye a *Trypanosoma* y *Leishmania*. Y a su vez, el género *Trypanosoma* se puede dividir en subgrupos o clados, como el *T. brucei* en África y el *T. cruzi* en América.

El parásito hemoflagelado cuenta con cuatro estadios morfológicos (tripomastigote metacíclico y sanguíneo, amastigote y epimastigote) que le permiten interactuar con el medio extracelular, incluyendo la sangre del hospedero, el espacio intracelular y el lumen del intestino del vector.

1.2.1. Ciclo biológico de *T. cruzi*

T. cruzi infecta a hospederos vertebrados e invertebrados durante ciertas etapas de su ciclo de vida (**Figura 4**) (Bern et al., 2011).

El ciclo biológico, comienza cuando un vector triatomino ingiere tripomastigotes sanguíneos al succionar sangre de un mamífero infectado. Ya ingeridos, muchos de los tripomastigotes son lisados en el estómago del insecto, pero los que sobreviven continúan su avance hacia el intestino del mismo (de Souza et al., 2010). En el intestino medio del vector, los tripomastigotes se transforman a una forma intermediaria llamada epimastigote, que es la forma replicativa del parásito dentro del hospedero invertebrado. Dichos epimastigotes migran después al intestino posterior y se diferencian en pocos días (aproximadamente dos semanas), en una fase infectiva denominada tripomastigote metacíclico, siendo ésta la forma que se excreta en la orina y heces del vector. Los tripomastigotes pueden penetrar a través de la lesión que deja la picadura del insecto hematófago ayudados por el rascado que realiza el nuevo hospedero sobre su piel, o bien, por la membrana de mucosas intactas.

T. cruzi puede invadir todo tipo de células nucleadas utilizando un mecanismo mediado por lisosomas. Así, durante la invasión celular, los tripomastigotes se engloban en una vacuola lisosomal y escapan de ese ambiente ácido para luego perder su flagelo y transformarse en amastigotes ya estando en el citoplasma celular (proceso que tarda alrededor de 20 minutos) (Espinoza and Manning-Cela, 2007). Los amastigotes son la forma replicativa intracelular del parásito (Teixeira et al., 2011) dividiéndose por fisión binaria aproximadamente cada 12 horas por un periodo de cuatro a 5 días. Al final de este periodo, los amastigotes se transforman en tripomastigotes

sanguíneos que provocan mecánicamente la lisis de la célula hospedera para ser liberados a la circulación. Los parásitos circulantes pueden invadir nuevas células e iniciar nuevos ciclos replicativos o estar disponibles para infectar a los vectores que se alimenten del hospedero (Bern et al., 2011).

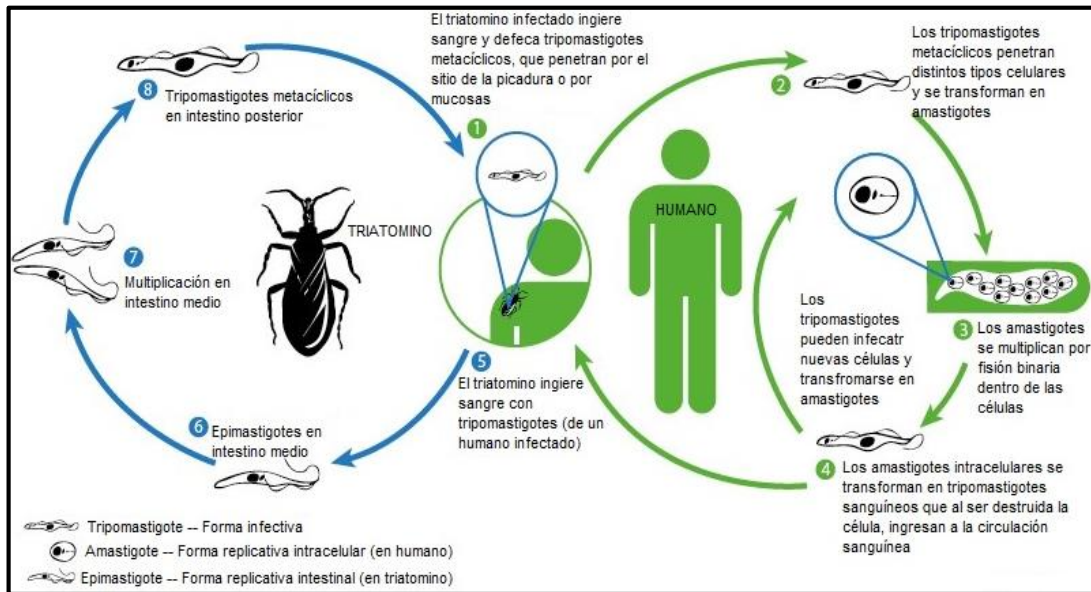


Figura 4. Ciclo biológico de *T. cruzi*. Consta de dos fases, una en el hospedero invertebrado (triatomino) y otra en el hospedero vertebrado (mamífero). El vector se infecta al alimentarse de sangre con parásitos. Los tripomastigotes sanguíneos ingeridos se transforman en epimastigotes, se multiplican y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos en el intestino del vector. El insecto infectado se alimenta nuevamente y deposita sus heces con tripomastigotes cerca de la herida ocasionada por la picadura o en mucosas como la conjuntiva, permitiendo la entrada de los parásitos al mamífero. En el interior del hospedero, los tripomastigotes invaden a las células cercanas a la inoculación, donde se diferencian en amastigotes, que se multiplican por fisión binaria y se diferencian en tripomastigotes, para ser liberados en la circulación sanguínea tras la ruptura de la célula hospedera. Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar nuevas células y continuar el ciclo biológico de *T. cruzi* o ser ingeridos por otro vector. Tomada y modificada de CDC, 2015.

1.2.2. Genoma de *T. cruzi*

En 1990 dio inicio la secuenciación del genoma de *T. cruzi*, usando a la cepa CL Brener. Esta cepa, aislada del vector intradomiciliario *Triatoma infestans*, fue elegida como referencia ya que hasta ese momento era la cepa mejor estudiada. Se tenía documentada su infectividad en ratones, su tropismo por células del músculo liso, se sabía que genera una evidente fase aguda post-infección y que muestra susceptibilidad a los agentes tripanocidas Benznidazol y Nifurtimox (Zingales et al., 1997).

Fue en el año 2005 cuando se publicó el genoma de la cepa CL Brener, así como los genomas de *T. brucei* y *Leishmania major* (Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005a; El-Sayed et al., 2005b; Ivens et al., 2005).

El genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener, consta de 41 cromosomas (Reis-Cunha et al., 2015) con 60.3 Mpb, que codifican para aproximadamente 22,570 proteínas, incluyendo 12,570 pares alélicos y 3,590 pseudogenes. CL Brener es una cepa híbrida, ya que se identifican en ella a dos haplotipos diferentes llamados Esmeraldo-*like* y no-Esmeraldo-*like*, por lo que se estima que el genoma diploide es de 110 Mpb. De los 22,570 marcos de lectura abiertos u ORFs (por sus siglas en inglés, *Open Reading Frame*) 6,159 corresponden al haplotipo Esmeraldo-*like*, y 6,043 corresponden al haplotipo no-Esmeraldo-*like*. Los restantes 10,368 ORFs no se han asociado a un haplotipo específico, por lo que corresponden a cualquiera de los dos. El contenido de G+C en el genoma es de 51% (El-Sayed et al., 2005a).

Las secuencias de ADN codificante o CDS (por sus siglas en inglés, *Coding DNA Sequence*) tienen una longitud promedio de 1,513 pb, generalmente carecen de intrones y su contenido de G+C (53.4%) es significativamente más alto, comparado con las regiones inter-CDS (47%) (El-Sayed et al., 2005a).

El 50% del genoma de *T. cruzi* consiste en secuencias repetidas como retrotransposones, repetidos subteloméricos y genes de grandes familias de moléculas de superficie, incluyendo *trans*-sialidasas, mucinas, gp63s y genes

de proteínas de superficie asociadas a mucinas o MASP (por sus siglas en inglés, *Mucin-Associated Surface Protein*) (El-Sayed et al., 2005a).

Actualmente sólo se han caracterizado 2,784 genes codificantes de proteínas, lo que representa sólo un 10% del proteoma de *T. cruzi* (Atwood et al., 2005).

Además de secuenciar a la clona CL Brener, también se han secuenciado otras cepas del parásito como: Esmeraldo cl3 (DTU TcII), SO3 cl5 (DTU TcV) y Sylvio X-10 cl11 (DTU TcI), que constan de aproximadamente 65, 72, y 44 cromosomas con un genoma de 78.5 Mpb, 94.7 Mpb y 46.8 Mpb respectivamente (Vargas et al., 2004). No obstante, las cepas de *T. cruzi* más utilizadas en estudios experimentales son: Sylvio X-10 (DTU TcI), Y (DTU TcII), CL Brener (DTU TcVI) y Tulahuen (DTU TcVI) (Teixeira et al., 2012).

1.2.2.1. Diversidad genética de *T. cruzi*

Ya que *T. cruzi* es genéticamente heterogéneo, a sus cepas se les clasifica comúnmente en 6 grupos o linajes, llamados Unidades de Tipificación Discretas o DTUs (por sus siglas en inglés, *Discrete Typing Unit*), que se nombran de TcI a TcVI (Zingales et al., 2012).

Por citar algunos ejemplos, las cepas Sylvio X-10 y Dm28c pertenecen al DTU TcI, las cepas Esmeraldo y Y pertenecen al DTU TcII, y la cepa de referencia ya secuenciada CL Brener pertenece al DTU TcVI (Souza et al., 2011; Zingales et al., 2012).

Estos grupos poseen diferente distribución geográfica y diferentes características biológicas y bioquímicas, además de que producen en células humanas un impacto inmunológico y perfiles inflamatorios distintos durante la infección temprana, lo cual puede influenciar en la progresión de la enfermedad (Magalhães et al., 2015).

Las cepas con DTUs TcI y TcII son consideradas ancestrales (Magalhães et al., 2015), mientras que las cepas con DTUs TcV y TcVI son producto de al menos 2 eventos de hibridación (el primero entre las DTUs TcI y TcII y el

segundo entre las DTUs TcII y TcIII) (Zingales et al., 2012). En el caso de las cepas con DTUs TcIII y TcIV, se desconoce su origen (Bern et al., 2011).

El genotipo TcI se encuentra distribuido a lo largo de todo el continente americano, pero predomina en América del norte y central. Por lo tanto TcI es la DTU predominante en México, aunque también están presentes las DTUs TcII, TcIII, TcIV y TcV (Ramos-Ligonio et al., 2012).

Las DTUs TcII, TcV y TcVI, son las que se reportan más comúnmente como causantes de la enfermedad de Chagas y las tres se han asociado principalmente al vector doméstico *Triatoma infestans* (Bern et al., 2011); Zingales et al., 2012).

Recientemente, en Brasil, Panamá y Colombia, se ha determinado un linaje nuevo asociado específicamente a murciélagos, conocido como Tcbat. Se considera único y divergente a los grupos TcI-TcVI ya que Tcbat muestra un genotipo y perfil filogenético independiente a todos los demás. Se especula que esta variante tiene ancestros comunes con los linajes ya conocidos (Lima et al., 2015).

1.2.2.2. Organización del genoma nuclear de *T. cruzi*

El genoma de *T. cruzi* está organizado en unidades de transcripción policistrónica o PTUs (por sus siglas en inglés de *Policistronic Transcription Unit*) y a su vez, estas PTUs están conformadas por varios genes codificantes de proteínas no relacionadas funcionalmente (Liang et al., 2003). Puede haber decenas o hasta centenas de genes en una PTU, y en cada cromosoma hay al menos dos PTUs (**Figura 5**) (Martinez-Calvillo et al., 2010). La razón de la existencia de esta organización tan particular es que este tipo de organismos carece de regiones promotoras para cada gen, pero cuentan con un sitio de inicio de la transcripción para un grupo grande de genes. De tal modo que cuando la transcripción sucede en una PTU, se transcriben todos los genes que la conforman.

Las regiones localizadas entre las PTUs, se denominan regiones de cambio de hebra o SSRs (por sus siglas en inglés, *Strand Switch Region*) y tienen una longitud que varía de 100 pb a 10 Kb. Dependiendo de la orientación en que se lleve a cabo la transcripción, las SSRs pueden ser convergentes (cuando la transcripción de dos PTUs converge hacia una misma SSR y en sentido contrario a los telómeros) o divergentes (cuando la transcripción de las PTUs se dirige a los telómeros) (Liang et al., 2003; Ouellette and Papadopoulou, 2009; Riou and Yot, 1977). Se ha descrito que las SSRs convergentes podrían tener una función potencial como sitios de terminación de la transcripción, mientras que las SSRs divergentes se han asociado con el inicio de la transcripción (Liang et al., 2003; Ouellette and Papadopoulou, 2009).

Entre las PTUs también se pueden localizar genes como los que codifican ARNr y ARNt, mismos que se organizan en clústeres de dos a 10 genes y que son transcritos por la ARN polimerasa I (ARN Pol I) y ARN polimerasa III (ARN Pol III), respectivamente (Martinez-Calvillo et al., 2010).

1.2.2.3. Transcripción policistrónica en *T. cruzi*

Como se mencionó previamente, en *T. cruzi*, la mayoría aunque no todos los genes, se encuentran organizados en PTUs (Teixeira et al., 2011). En estos PTUs, los genes codificantes de proteínas son transcritos por la ARN polimerasa II (ARN Pol II). Luego de la transcripción se genera un ARNm policistrónico no funcional, y por lo tanto, la transcripción *de novo* de todos los genes pertenecientes a una misma PTU, es exactamente igual. En este punto, el ARNm no es funcional y para serlo, debe ser procesado en unidades monocistrónicas. Dicho procesamiento se lleva a cabo por medio de *trans-splicing* y poliadenilación (**Figura 5**) (El-Sayed et al., 2005a; El-Sayed et al., 2005b; Siegel et al., 2005).

El *trans-splicing* es un proceso que adiciona un miniexón o SL (por sus siglas en inglés, *Splice Leader*) de 39 nucleótidos muy conservados en la

región UTR 5' (por sus siglas en inglés, *Untranslated Region*) de cada ARNm, de este modo funge además como el cap necesario para dar estabilidad a su transcrito. El *trans-splicing* es catalizado por el spliceosoma y consta de dos reacciones de transesterificación, incluyendo la formación de una estructura en Y (en lugar del intermediario en forma de lazo, característico del *cis-splicing* que ocurre en otros organismos). El sitio aceptor del *trans-splicing* es el dinucleótido conservado AG (Adenina-Guanina), y río arriba de éste se requiere también de una región conservada rica en pirimidinas. Cabe destacar que en el locus del SL, no hay PTUs, cada gen posee una región promotora para la ARN Pol II que genera los mini exones (**Figura 5**).

Los eventos del *trans-splicing* se encuentran espacial y temporalmente coordinados con los eventos de poliadenilación (LeBowitz et al., 1993; Matthews et al., 1994). En este último, se adiciona una cola de poli A en el UTR 3' de los ARNm(s) para así generar unidades monocistrónicas funcionales listas para ser traducidas (**Figura 5**) (Daniels et al., 2010; El-Sayed et al., 2005b).

Para que *T. cruzi* pueda adaptarse a los diferentes ambientes en sus dos hospederos, así como lograr diferenciarse en sus cuatro estadios morfológicos, el parásito requiere contar con mecanismos eficientes de control de la expresión genética. Como consecuencia de la transcripción policistrónica, la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos se lleva a cabo principalmente a nivel post-transcripcional (Martinez-Calvillo et al., 2010). Se ha descrito que tanto el UTR 5' y el UTR 3' se encuentran involucrados en mecanismos de estabilización y desestabilización, sobrerregulación y regulación a la baja, de los niveles de ARNm durante el desarrollo del parásito (Greif et al., 2013; Kolev et al., 2010).

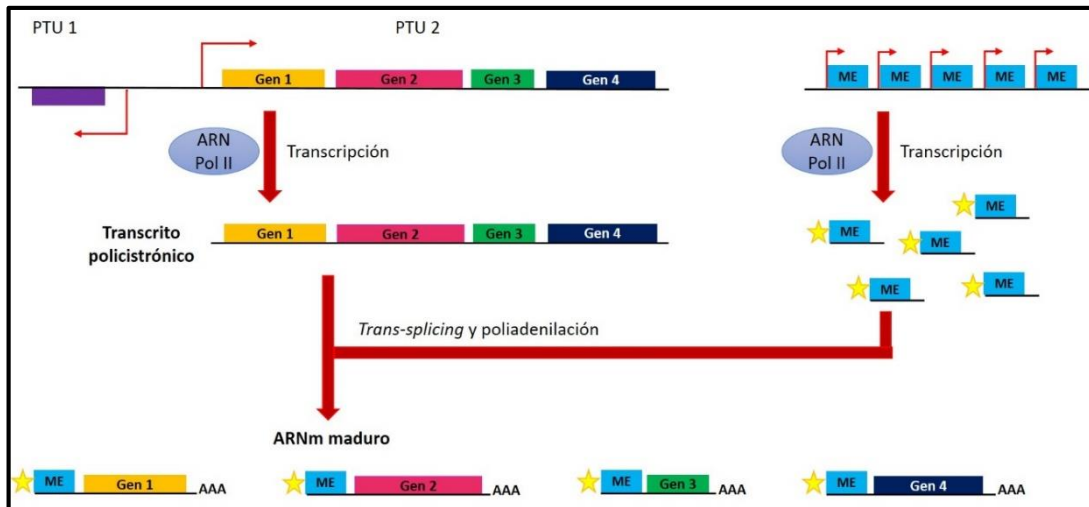


Figura 5. Transcripción policistrónica y procesamiento del ARNm en tripanosomátidos. En la parte superior de la figura se representan dos unidades de transcripción policistrónica o PTUs (por sus siglas en inglés, *Polycistronic Transcription Units*). La transcripción llevada a cabo por la ARN Pol II comienza río arriba del primer gen de cada PTU (en flechas) y produce un transcrito primario policistrónico que se procesa por *trans-splicing* y poliadenilación generando un ARNm maduro. En el *trans-splicing*, un miniexón o SL (por sus siglas en inglés, *Splice Leader*) (cuadrado azul) se adiciona a cada transcrito en la posición 5'. En el locus del SL (localizado en otro cromosoma) cada gen posee una región promotora para la ARN Pol II (en flechas). En el extremo 3' de cada transcrito maduro se localiza una cola de poli (A) (Martínez-Calvillo et al., 2010).

II. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1. Proteínas de unión al ARN

Los tripanosomátidos regulan su expresión genética principalmente por mecanismos post-transcripcionales (Caro et al., 2006).

Hay varios motivos localizados en la región UTR 3' de los transcritos, con los cuales se ha demostrado la posibilidad de modificar *in vivo* la abundancia del ARNm a través de su interacción con factores que actúan en posición *trans*, como las proteínas de unión al ARN o RBPs (por sus siglas en inglés, *RNA-Binding Protein*) (D'Orso et al., 2003).

Las RBPs cumplen diversas funciones al unirse al ARNm, ya que pueden participar del procesamiento del mismo durante el *trans-splicing* (por ejemplo las RBPs que forman parte del spliceosoma) y la poliadenilación, en donde las RBPs pueden estabilizar o desestabilizar al transcrito. Además participan en el transporte del ARNm desde el núcleo al citoplasma celular y pueden intervenir en la eficiencia de la traducción, estimulándola o reprimiéndola.

Para cumplir con sus funciones, las RBPs interactúan con elementos reguladores localizados en *cis*, principalmente en la región UTR 3' del ARNm de tripanosomátidos, aunque también pueden estar la región UTR 5' y en regiones codificantes. Dichas proteínas no sólo tienen la capacidad de asociarse al ARNm, sino que también se pueden asociar a otros ARNs y formar ribonucleoproteínas. Esto lo pueden hacer porque cuentan con motivos o dominios específicos que son afines al ARN.

Hay diversos dominios de este tipo, por ejemplo, los motivos de reconocimiento de ARN o RRM (por sus siglas en inglés, *RNA-Recognition Motif*), los motivos ricos en arginina o ARM (por sus siglas en inglés, *Arginine-Rich Motif*), las cajas RGG (Arginina-Glicina-Glicina), los dedos de zinc CCCH o CCHC (Cisteína-Cisteína-Cisteína-Histidina o Cisteína-Cisteína-Histidina-Cisteína), los dominios ALBA (por sus siglas en inglés, *Acetylation Lowers Binding Affinity*), los motivos KH (por sus siglas en inglés, *K Homology*), los dominios CSD (por sus siglas en inglés, *Cold Shock Domain*) y los dominios pumilio, entre otros. Para su unión al ARN, las RBPs de tripanosomátidos contienen más comúnmente motivos RRM, dedos de zinc CCCH o CCHC, dominios ALBA y dominios pumilio (**Figura 6**) (De Gaudenzi et al., 2005).

Cada motivo o dominio se une aproximadamente a cuatro nucleótidos del ARN, a excepción de las proteínas con el dominio pumilio que se unen a 8 nucleótidos. Estos nucleótidos son específicos para cada RBP, de modo que la mayoría de ellas reconoce a secuencias diferentes, logrando que el reconocimiento y la interacción del ARN y la RBP sean muy específicos. Por esta razón, no todas las RBPs se unen a todos los transcritos y sólo se unen a aquellos sobre los cuales deben ejercer su función y que cumplan con la

característica de tener en su secuencia a los nucleótidos que la proteína reconoce habitualmente.

Las RBPs pueden contener varios motivos o dominios de unión al ARN del mismo tipo o diferentes. Además, varias RBPs podrían unirse al mismo tiempo en un solo transcrito ya que se estima que una proteína puede unirse al ARNm cada 20 nucleótidos, dependiendo del impedimento estérico entre ellas o de las estructuras secundarias que el ARNm pueda formar. Por lo tanto, el sitio UTR 3', que en algunos transcritos de *T. brucei* es de aproximadamente 400 nucleótidos, es capaz de albergar hasta a 20 RBPs, aunque esto dependerá de la longitud real de la región UTR y de las proteínas que se unan a él (Clayton, 2014).

A continuación, se abordan algunas particularidades de los principales dominios de unión al ARN encontrados en tripanosomátidos.

El motivo de reconocimiento de ARN (RRM), que también es conocido como dominio de unión al ARN (RBD, por sus siglas en inglés, *RNA-Binding Domain*) (Clery et al., 2008), tiene aproximadamente 70-90 residuos de aminoácidos y su estructura consiste en cuatro cadenas β -plegadas y dos α -hélices ($\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ - $\beta 4$) (Kolev et al., 2014). Este motivo, incluye el octapéptido canónico RNP1 (K/R)G(F/Y)(G/A)FVX(F/Y) y otra secuencia de 6 aminoácidos llamada RNP2 localizadas en las dos láminas β centrales ($\beta 1$ y $\beta 3$), con las cuales se lleva a cabo la unión al ARNm en una secuencia de dos a 6 nucleótidos (Alves and Goldenberg, 2016) (**Figura 6A**).

Hasta el momento, en *T. brucei* se han identificado 75 proteínas que contienen al menos un motivo RRM, pero sólo se ha determinado la función de 18 de ellas (De Gaudenzi et al., 2005). Por otro lado, en *T. cruzi* se ha determinado la existencia de 81 proteínas que contienen al menos un motivo RRM, pero de éstas, muy pocas han sido estudiadas (Guerra-Slompo et al., 2012). Un ejemplo es la proteína PABP1 (por sus siglas en inglés, *Poly(A)-Binding Protein*) presente en *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania*, que está involucrada en la estabilidad del ARNm al que se le une, dado que la degradación de un transcrito comienza generalmente por el extremo 3' en

donde la presencia de PABP puede proteger de enzimas mejorando dicha estabilidad. Se ha visto que también afecta la traducción del transcrito blanco, a través de su interacción con la cola de poli(A) presente al final del ARNm y con los polisomas (D'Orso et al., 2003).

Los dominios CCCH y CCHC representan subclases de la gran familia de dedos de zinc, con una estructura característica en forma de disco y una preferencia aparente por la unión al ARNm en elementos ricos en AU (AREs, por sus siglas en inglés, *AU Rich Elements*) (**Figura 6B**). El genoma de *T. brucei*, codifica 48 proteínas con el dominio CCCH. Un ejemplo es ZFP3, que se une específicamente a algunos mensajeros que codifican proteínas de superficie del estadio procíclico del parásito, y cuya sobreexpresión promueve su traducción. Además, se ha observado en ensayos con ARN de interferencia (ARNi) (*knock down* de ZFP3) que los niveles de expresión de los transcritos blancos de ZFP3, decrecen significativamente en ausencia de esta RBP. Otro ejemplo es ZC3H20, que es requerida para el crecimiento de las formas procíclicas, como se demostró con ensayos de parásitos *knock down* obtenidos también con ARNi, en los que se observó que un grupo de 12 transcritos se encontraban bastante disminuidos en comparación con parásitos sin el ARNi, denotando así que la falta de esta RBP tiene un efecto negativo en ciertos mensajeros (Clayton, 2013). Contrario a lo reportado en *T. brucei*, en *T. cruzi* no se han estudiado a muchas proteínas con estos dominios.

Las proteínas con el dominio ALBA además de poseer este dominio, generalmente contienen un tramo C-terminal de múltiples repetidos RGG que les permiten asociarse tanto al ARN como al ADN. Su estructura de aproximadamente 70 aminoácidos se compone de cuatro cadenas β -plegadas y dos α -hélices ($\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\beta 4$) similar al motivo RRM (Kolev et al., 2014) (**Figura 6C**). Hay cuatro proteínas de *T. brucei* con un dominio reconocible ALBA. ALBA2 y ALBA3 son proteínas del parásito que se asocian a polisomas y se ha comprobado que su *knock down* afecta la traducción de los transcritos (Clayton, 2013). También se ha comprobado que la proteína ALBA3 está

involucrada en el proceso de diferenciación de *T. brucei* dentro del intestino de la mosca tsetse, que es su vector (Subota et al., 2011). También en *T. cruzi* se han reportado recientemente cuatro proteínas con un dominio ALBA, la más estudiada hasta el momento es llamada TcAlba30 y está involucrada en el control negativo de la expresión del mensajero de β -amastina al interactuar con su UTR 3' (Perez-Diaz et al., 2017).

Las proteínas PUF, con el dominio pumilio, pueden regular la estabilidad y la traducción de los transcritos al unirse a ellos. El dominio consiste en repetidos en tándem de α -hélices (por lo regular son 8 repetidos), que interactúan cada uno con una base de la secuencia de ARNm reconocida (**Figura 6D**). Los sitios del ARNm unidos a los dominios PUF usualmente contienen el trinucleótido UGU. *T. brucei* alberga 11 genes que codifican para proteínas de la familia PUF (Kolev et al., 2014). De estas proteínas, PUF9 que reconoce un motivo específico UUGUAC en el ARNm, es la única proteína con un rol definido en la degradación de los transcritos que se encuentran en exceso durante la fase G1 del ciclo celular (Clayton, 2013). Por otro lado, en *T. cruzi*, la familia de proteínas PUF se compone de 10 miembros cuyos blancos incluyen transcritos correspondientes a proteínas mitocondriales y cinasas (Caro et al., 2006). En general, la función mejor caracterizada de las proteínas con el dominio pumilio, es como un represor post-transcripcional (Alves and Goldenberg, 2016).

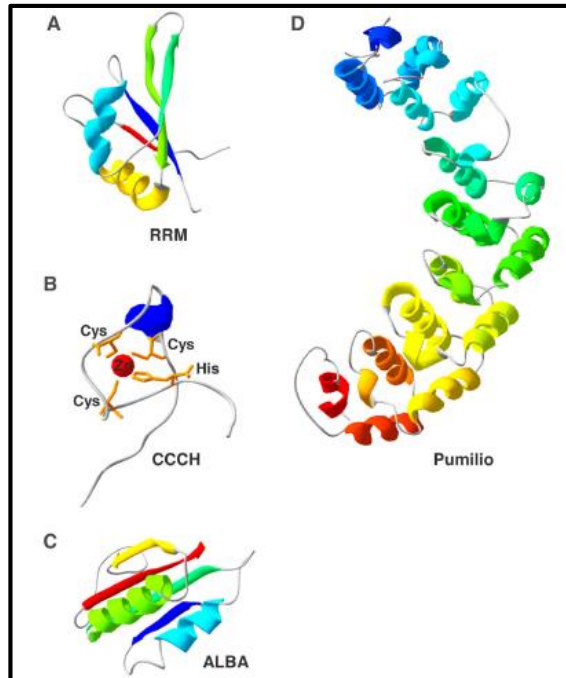


Figura 6. Estructura de los dominios proteicos de unión al ARN. A) Motivo de reconocimiento de ARN (RRM). **B)** Dedos de zinc CCCH. **C)** Dominio ALBA. **D)** Dominio pumilio. Tomada de Kolev et al., 2014.

En la **Tabla 1** se muestran algunas proteínas de unión al ARN ya identificadas en los tres tripanosomátidos más estudiados (*T. brucei*, *L. major* y *T. cruzi*). No se conoce la función de todas ellas, por lo que de la mayoría se requiere investigar a fondo la función propuesta.

Tabla 1. Proteínas de unión al ARN, identificadas en los tres tripanosomátidos más estudiados.

Proteína	Organismo	Estadio de expresión	Posible función	Dominio que posee	Tamaño (KDa)	Referencia
PABP1	<i>L. major</i>	Todos los estadios	Traducción de ARNm	-----	-----	(Bates et al., 2000)
PABP1	<i>T. brucei</i>	No definido	Traducción de ARNm	RRM	66	(Hotchkiss et al., 1999)
<i>Tb</i> PUF1	<i>T. brucei</i>	No definido	Estabilidad de ARNm	Pumilio	55	(Hoek et al., 2002)

TbRRP4	<i>T. brucei</i>	Procíclico y tripomastigotes sanguíneos	-----	-----	32.7	(Estevez et al., 2001)
TbRRP40	<i>T. brucei</i>	Procíclico	Exonucleasa. Subunidad del exosoma	-----	32	(Estevez et al., 2001)
TbCSL4	<i>T. brucei</i>	Procíclico	Exonucleasa. Subunidad del exosoma	-----	32.6	(Estevez et al., 2001)
TbRRP6	<i>T. brucei</i>	Procíclico	Exonucleasa. Subunidad del exosoma	ARNasa D	78.6	(Estevez et al., 2001)
TbRRP41A	<i>T. brucei</i>	Procíclico	Exonucleasa. Subunidad del exosoma	ARNsa PH	27.6	(Estevez et al., 2001)
TbRRP41B	<i>T. brucei</i>	Procíclico	Subunidad del exosoma	ARNsa PH	28	(Estevez et al., 2001)
TbRRP44	<i>T. brucei</i>	Procíclico y tripomastigotes sanguíneos	Exonucleasa. Subunidad del exosoma	ARNsa II	109	(Estevez et al., 2001)
TbRRP45	<i>T. brucei</i>	Procíclico y tripomastigotes sanguíneos	Exonucleasa. Subunidad del exosoma	ARNsa PH	38.9	(Estevez et al., 2001)
Nopp	<i>T. brucei</i>	Procíclico, no definido en tripomastigotes sanguíneos	Unión a poli(rU) <i>in vitro</i>	RGG	44/46	(Das et al., 1996)
P34	<i>T. brucei</i>	Procíclico y tripomastigotes sanguíneos	Unión a 5S de ARNr	RRM	34	(Pitula et al., 2002)
P37	<i>T. brucei</i>	Procíclico y tripomastigotes sanguíneos	Unión a 5S de ARNr	RRM	37	(Pitula et al., 2002)
TSR1	<i>T. brucei</i>	Procíclico y tripomastigotes sanguíneos	Factor de <i>splicing</i> . Unión al 5' del SL del ARN	2-RRM y dominio SR	43	(Ismaili et al., 1999)
TSR1IP	<i>T. brucei</i>	Procíclico y tripomastigotes sanguíneos	Factor de <i>splicing</i> . Unión al 5' del SL del ARN	RRM, rico en SR	43	(Ismaili et al., 2000)
TbZFP1	<i>T. brucei</i>	Procíclico y tripomastigotes sanguíneos	Regulación del ciclo biológico	CCCH	11.4	(Hendriks et al., 2001)
TbZFP2	<i>T. brucei</i>	Procíclico y tripomastigotes sanguíneos	Regulación del ciclo biológico	CCCH	15.7	(Hendriks et al., 2001)
PABP1	<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes	Traducción de ARNm	RRM	66	(Batista et al., 1994)
TcUBP-1	<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes	Estabilidad de ARNm	RRM	27	(D'Orso and Frasch, 2001)
TcUBP-2	<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes	Estabilidad de ARNm	RRM	18	(D'Orso and Frasch, 2002)
TcRBP-3	<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes	Unión a poli(rA, rC, rG) <i>in vitro</i>	RRM	21	(D'Orso and Frasch, 2002)

TcRBP-4	<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes	Unión a poli(rG, rU) <i>in vitro</i>	RRM	16	(D'Orso and Frasch, 2002)
TcRBP-5	<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes	Unión a poli(rG, rU) <i>in vitro</i>	RRM	14	(D'Orso and Frasch, 2002)
TcRBP-6	<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes	Unión a poli(rG) <i>in vitro</i>	RRM	26	(D'Orso and Frasch, 2002)
TcSR	<i>T. cruzi</i>	No definido	<i>Cis splicing</i>	2-RRM y dominio SR	No definido	(Portal et al., 2003)
XB1	<i>T. cruzi</i>	Epimastigotes, no definido en tripomastigotes ni amastigotes	Factor de <i>trans-splicing</i> . Unión al SL del ARN	Similar a ScPRP31p	45	(Xu et al., 2001)

*Tomada de D'Orso et al., 2003.

2.1.1. Participación de RBPs, en la regulación del proceso de diferenciación e infección en tripanosomátidos

En recientes investigaciones se ha determinado que en *T. brucei*, hay una RBP llamada *TbRBP6*, la cual se encuentra mayormente expresada en el estadio infectivo del parásito (estadio metacíclico). Cuando se induce experimentalmente la sobreexpresión de esta proteína en las formas no infectivas (estadio procíclico), caracterizadas por presentar bajos niveles de *TbRBP6*, el parásito se transforma al estadio metacíclico. La transformación de estadio es concomitante con la expresión de las glicoproteínas variables de superficie o VSGs (por sus siglas en inglés, *Variable Surface Glycoprotein*), que se expresan regularmente en las formas infectivas de *T. brucei*. La infectividad de los parásitos procíclicos que sobreexpresan *TbRBP6*, y que se transformaron a metacíclicos, fue evaluada en ratones BALB/c. Estos ratones se infectaron eficientemente, comprobando que los parásitos sí se transformaron al estadio infectivo. Lo anterior demuestra que la proteína *TbRBP6* participa en la metaciclogénesis del parásito, la expresión de VSGs y la consecuente infectividad del mismo (Kolev et al., 2012).

En *T. cruzi* se han identificado algunas RBPs pero poco se sabe hasta el momento con respecto a su función. Hay una proteína llamada *TcRBP40* que se expresa diferencialmente durante la metaciclogénesis del parásito. Dicha

proteína tiene un dominio RRM, por medio del cual se une a secuencias ricas en AG en la región UTR 3' de sus blancos, que son transcritos que codifican proteínas involucradas en diferentes funciones celulares como el metabolismo de ácidos nucleicos y otros procesos metabólicos, así como en señalización, plegamiento de proteínas, ciclo celular y citoesqueleto. Un porcentaje sobresaliente (46%) de las secuencias de ARNm a las que se une *TcRBP40*, cuentan con secuencias transmembranales putativas. De manera interesante, durante el estadio de epimastigote esta proteína se localiza en el citoplasma, concentrándose en unos organelos específicos de *T. cruzi* llamados reservosomas, que se ha propuesto participan en la diferenciación de estadio del parásito, de estadios no infectivos al estadio infectivo. Por lo tanto, se propone que *TcRBP40* podría estar influenciando la diferenciación del parásito a su fase infectiva de tripomastigote metacíclico (Guerra-Slompo et al., 2012).

III. RESULTADOS PREVIOS

En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se llevó a cabo una caracterización biológica y molecular de aislados de *T. cruzi* obtenidos en el Estado de Oaxaca, México (Martínez-Cuevas, 2013. Tesis de Maestría). Para ello, se colectaron triatominos infectados en varias regiones de dicho estado, y a partir de éstos se obtuvieron y caracterizaron dos aislados de *T. cruzi*, nombrados como TcOAX-SSU-NM1-Tsp3 (NM1) y TcOAX-IST-CI2-TphM (CI2). Posteriormente, se analizó la parasitemia que éstos producían en un modelo murino, notándose que NM1 generó una muy alta parasitemia (aproximadamente 16 veces más que CI2), incluso mayor a la observada en las cepas de referencia Y y CL Brener, previamente reportadas como cepas altamente infectivas (Camargos et al., 2000; Rodrigues et al., 2010), mientras que CI2, por el contrario produjo muy baja parasitemia en los ratones. A partir de ambos aislados se generaron clonas, y con éstas se llevaron a cabo infecciones en fibroblastos HFF-1 y 3T3-NIH para determinar su infectividad en células en cultivo, seleccionándose la clona 1 (NM1-cl1) con mayor grado de infectividad (aproximadamente 5 veces más) proveniente del aislado NM1 y la clona 2 (CI2-cl2) con menor grado de infectividad proveniente del aislado CI2. Estas dos clonas fueron entonces utilizadas para llevar a cabo estudios de transcriptómica y proteómica diferencial. Para ambos ensayos se utilizaron tripomastigotes derivados de infecciones en fibroblastos HFF-1. En los estudios de transcriptómica se analizaron los ARNs mensajeros de ambas clonas, mediante la técnica de WTSS (por sus siglas en inglés, *Whole Transcriptome Shotgun Sequencing*) también conocida como RNA-seq (por sus siglas en inglés, *Ribonucleic Acid-sequencing*). Y para los ensayos de proteómica se usaron extractos totales de proteínas de ambas clonas, analizados por técnicas de secuenciación masiva MS/MS. Posteriormente se realizaron análisis bioinformáticos para identificar a las secuencias encontradas y determinar la expresión diferencial de las clonas.

3.1. Resumen de resultados de la expresión diferencial de NM1-cl1 y CI2-cl2

A partir de los datos obtenidos del RNA-seq se determinó la presencia de 4,938 transcritos que se expresan diferencialmente en NM1-cl1 y CI2-cl2, de los cuales 1,714 corresponden a la clona con mayor grado de infectividad NM1-cl1 y 2,384 corresponden a la clona menos infectiva CI2-cl2. Para el análisis se utilizó el genoma de la cepa de referencia Sylvio X-10 (con 10,876 ORFs reportados) debido a que corresponde al mismo DTU (Tcl) que las clonas estudiadas. Las secuencias de los transcritos que se expresan diferencialmente en NM1-cl1, corresponden aproximadamente al 15.76% del genoma del parásito y al 21.92% en el caso de CI2-cl2.

Por medio de espectrometría de masas y del análisis *in silico* de los resultados obtenidos, se determinó la presencia de 718 secuencias proteicas que se expresan diferencialmente en NM1-cl1 y CI2-cl2, de las cuales 467 corresponden a NM1-cl1 y 251 a CI2-cl2. De acuerdo con el genoma reportado en la cepa de referencia Sylvio X-10 usada para el análisis, las secuencias proteicas que se expresan diferencialmente en NM1-cl1 representan 4.29% del proteoma del parásito y 2.30% en el caso de CI2-cl2.

De los resultados obtenidos anteriormente, identificamos a una secuencia nombrada como TCSYLVIO_006186, que se expresa diferencialmente tanto a nivel de transcrito como de proteína en NM1-cl1 (con mayor grado de infectividad) con respecto a CI2-cl2 (con menor grado de infectividad). Esta secuencia corresponde a una proteína de unión al ARN (RBP) putativa, siendo ésta la única RBP expresada diferencialmente en NM1-cl1. A esta proteína la hemos denominado *TcRBP-like* de *T. cruzi*, y es el objetivo de estudio en este trabajo de investigación.

IV. JUSTIFICACIÓN

El ciclo intracelular de *T. cruzi* es un proceso complejo que involucra diversos pasos consecutivos, iniciando con el reconocimiento y adhesión a la célula blanco por parte de moléculas específicas de la membrana del parásito. Posterior a su internalización mediante una vacuola parasitófora, el parásito es liberado al citoplasma de la célula hospedera en donde se diferencia a amastigote, replica y diferencia nuevamente a tripomastigote sanguíneo, el cual lisa a la célula infectada y propaga la infección. Durante este proceso, es necesario que el parásito exprese genes que codifican distintas proteínas que participan en las diferentes etapas de unión, internalización, diferenciación, multiplicación y salida del parásito de la célula blanco, lo que indudablemente requiere de una compleja regulación genética.

A diferencia de la mayoría de los organismos eucariontes que controlan la expresión de sus genes a nivel transcripcional, *T. cruzi* lo hace a nivel post-transcripcional, debido a la naturaleza policistrónica de sus genes. Esto lo puede hacer regulando la eficiencia de *trans-splicing* y poliadenilación, así como a través de RBPs.

Las RBPs actúan como moduladores de la abundancia de los ARNm(s) y de su eficiencia de traducción. En *T. brucei*, se ha observado que hay RBPs que pueden regular el nivel de un grupo de transcritos relacionados funcionalmente en la infectividad del parásito.

A pesar de la importancia que tienen estas RBPs en la regulación de la expresión en tripanosomátidos, son pocas las que han sido caracterizadas en *T. cruzi*.

V. HIPÓTESIS

TcRBP-like de *T. cruzi* es una proteína de unión al ARN del parásito.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Determinar si *TcRBP-like* es una proteína de unión al ARN.

6.2. Objetivos Particulares

1. Realizar el análisis bioinformático de *TcRBP-like* de *T. cruzi*, obtenida en ensayos de transcriptómica y proteómica diferencial entre dos cepas del parásito (NM1-cl1/alta infectiva y Cl2-cl2/baja infectiva) con diferente grado de infectividad.
2. Comprobar la posible unión *in vitro* de *TcRBP-like* recombinante al ARN del parásito, usando el ensayo de ARN *pull-down*.
3. Clonar e identificar por secuenciación el ARNm unido a *TcRBP-like* de *T. cruzi*, obtenido en los ensayos de ARN *pull-down*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Análisis bioinformático

Se analizó *in silico* la secuencia TCSYLVIO_006186 proveniente del genoma de la cepa Sylvio X-10 de *T. cruzi*, usada como referencia para predecir algunas características de *TcRBP-like*. Se determinó el número de genes y se examinaron sus ortólogos y otras secuencias con las que mantiene similitud usando la base de datos de tripanosomátidos *TriTrypDB* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Se determinaron también ciertas propiedades fisicoquímicas con *ProtParam tool* (<http://web.expasy.org/protparam/>), dominios conservados y posibles modificaciones post-traduccionales en el programa *ScanProsite* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>). Además, la secuencia en estudio se comparó con las secuencias de las proteínas consignadas en las bases de datos utilizando *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-NCBI-NIH* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se hicieron los alineamientos pertinentes con *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Con el programa bioinformático *NucPred* (www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/) se realizó una búsqueda de señales de localización nuclear dentro de la secuencia en estudio. Usando *GOR IV* (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html) y con el programa SAS (*Sequence Annotated by Structure*) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/>) se obtuvo la estructura secundaria de la proteína en estudio y la estructura tridimensional probable de *TcRBP-like* con el programa *SWISS-MODEL* (<https://swissmodel.expasy.org/>).

7.2. Cultivos de parásitos

Se utilizaron cultivos de parásitos *T. cruzi* NM1-cl1 (con mayor grado de infectividad). Para el mantenimiento de los cultivos a una razón de 1:10 se usó un inóculo de 0.5 mL de un cultivo de epimastigotes por cada 5 mL de medio

LIT (por sus siglas en inglés, *Liver Infusion Tryptose*) (NaCl 60 mM, KCl 5.36 mM, Na₂HPO₄ 29 mM, C₆H₂O₆ 11 mM, infusión de hígado, Triptosa) complementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino), 0.5% de ampicilina-estreptomocina y 0.1 mg/mL de hemina en tubos falcon de 15 mL, incubados a 28° C. En estas condiciones, los parásitos fueron resembrados cada cuatro días manteniendo el cultivo en fase logarítmica para uso experimental.

7.3. Extracción de ADN de parásitos

El ADN de epimastigotes NM1-cl1 se extrajo a partir de 1×10^9 parásitos en fase logarítmica de crecimiento. Dichos parásitos se centrifugaron a 4,000 rpm durante 5 min. La pastilla que se obtuvo se lavó dos veces con 1 mL de tampón fosfato salino 1X (PBS, por sus siglas en inglés, *Phosphate Buffered Saline*) (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) y luego, las células se resuspendieron en 400 µL de solución de GUISCN (Isotiocianato de Guanidina 0.4 M, Citrato de Sodio 1 mM, Sarcosil 0.5 mM, β-mercaptoetanol 5.4 mM). Se adicionaron 600 µL de etanol frío al 80% para obtener una red de ADN, la cual se lavó dos veces con etanol al 70%, y posteriormente se suspendió en 500 µL de TE (Tris-EDTA) (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) y 3 µL de ARNasa A (20 µg/mL) (*Invitrogen* Cat. No. R4875). Se adicionó *buffer* de proteinasa K 2X (Tris-HCl 20 mM, EDTA 10 mM, SDS 5 mM) así como proteinasa K (1 mg/mL) y se incubó a 37° C durante una hora. Después se extrajo la muestra con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 en una relación v/v) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min para recuperar la fase acuosa. Se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriores después de extraer la muestra con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se obtuvo la fase acuosa a la cual se le agregó NaOAc 3M (1:10 v/v) y 1 volumen de etanol absoluto frío. Se recuperó la red de ADN y finalmente se resuspendió el ADN en 50 µL de TE.

7.4. Preparación de células calcio-competentes *E. coli*

Una colonia de células *E. coli* DH5 α , BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS fue sembrada en 20 mL de medio LB (Luria-Bertani para 1 litro: Triptona 10 g, Extracto de Levadura 5 g, NaCl 10 g), adicionado con 20 μ L de cloranfenicol 30 mg/mL solo para el caso de las células BL21(DE3)pLysS. Se incubaron toda la noche a 37 $^{\circ}$ C en agitación constante. Al siguiente día, a 10 mL de medio TYM (Bacto-Triptona 2%, Extracto de Levadura 0.5%, NaCl 0.1 M, MgSO $_4$ 10 mM) se le adicionaron 300 μ L del cultivo previo y se dejaron crecer hasta una densidad de 0.2-0.8 medida a 600 nm, incubando a 37 $^{\circ}$ C en agitación constante. A continuación se añadieron 50 μ L de medio TYM y se dejó crecer a 37 $^{\circ}$ C en agitación constante hasta una densidad de 0.5-0.9 a 600 nm. Luego se adicionó medio TYM hasta completar un volumen final de 250 mL y se incubó a 37 $^{\circ}$ C en agitación constante hasta obtener una densidad exacta de 0.6 a 600 nm. Se centrifugó el cultivo a 2,500 rpm durante 8 min a 4 $^{\circ}$ C. La pastilla fue resuspendida suavemente en 50 mL de TBF I (KOAc 30 mM, MnCl $_2$ 50 mM, KCl 100 mM, CaCl $_2$ 10 mM, Glicerol 15%) evitando la lisis celular y manteniendo las células a 4 $^{\circ}$ C, posteriormente se centrifugó otra vez en las mismas condiciones antes mencionadas. Finalmente la pastilla fue resuspendida en 6 mL de TBF II (MOPS 10 mM pH 7, CaCl $_2$ 75 mM, KCl 10 mM, Glicerol 15%), las células competentes se alicuotaron en tubos eppendorf (150 μ L en cada tubo) y se almacenaron a -70 $^{\circ}$ C.

7.5. Amplificación y clonación de la proteína recombinante *TcRBP-like*

La región codificante de *TcRBP-like* fue amplificada por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) utilizando ADN de la cepa NM1-cl1 como templado, en un volumen final de reacción de 50 μ L con: 2 μ L de ADN total de epimastigotes NM1-cl1, 2.5 μ L de MgSO $_4$, 16 μ L de dNTPs 1.25 mM, 5 μ L de *buffer Platinum Taq* 10X, 0.5 μ L de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen Cat. No.

11304-011) y 1 µL de los oligonucleótidos sentido y antisentido descritos en la **Tabla 2**, completando el volumen con agua estéril. Las reacciones se llevaron a cabo durante 1 ciclo de 98° C/5 min, 30 ciclos a 94° C/30 s, 65° C/30 s, 68° C/2 min y 1 ciclo a 68° C/7 min.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar a *TcRBP-like*

Bandera	Oligonucleótido	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Enzima
His	Sentido	HisTcRBP-likeS	ccg ctcgag atgaactacgcagcag	XhoI
	Antisentido	HisTcRBP-likeAS	ccg gaattc ctattctcctcctttcacctgagcg	EcoRI
GST	Sentido	GSTTcRBP-likeS	ccg gaattc atgaactacgcagcag	EcoRI
	Antisentido	GSTTcRBP-likeAS	ccg ctcgag ctattctcctcctttcacctgagcg	XhoI

*Dentro de la secuencia (5'-3') de los oligonucleótidos, se indican en letras rojas las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción usadas.

Los fragmentos amplificados fueron purificados con el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel Cat. No. 740609.10/.50/.250) y posteriormente al producto se le realizó una reacción de *A-tailing* con 15 µL del amplificado puro, 2.5 µL de *buffer Taq DNA Polymerase, recombinant* (Invitrogen), 0.3 µL de *Taq DNA Polymerase, recombinant* (Invitrogen), 1.2 µL de MgCl₂, 5 µL de dATPs 1.25 mM y 1 µL de agua estéril, para un volumen final de 25 µL de reacción.

Las secuencias de *TcRBP-like* fueron clonadas primero en el vector de clonación pGEM-T Easy (*Promega* Cat. No. A1360), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Posteriormente se subclonaron las secuencias en vectores de expresión. El vector pRSET-A (*Invitrogen* Cat. No. V35120) se usó para producir la proteína recombinante *TcRBP-like* fusionada con la bandera His (histidina). Con este vector se transformaron bacterias *E. coli* BL21(DE3) pLysS. El vector pGEX-4T-1 (*Sigma-Aldrich* Cat. No. 27458001) se usó para producir la proteína recombinante unida a la bandera GST, y esta construcción fue transformada en bacterias *E. coli* BL21(DE3). Para ambas clonaciones se siguieron las especificaciones del proveedor.

7.6. Transformación bacteriana mediante choque térmico

La transformación de bacterias *E. coli* DH5 α , BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS con los plásmidos utilizados en este trabajo, se realizó mediante choque térmico colocando en un tubo de vidrio con tapa, el ADN de plásmido (1 μ L) o en su caso la reacción de ligación (10 μ L). Se adicionaron 50 μ L de las células calcio-competentes. Posteriormente se les aplicó un choque térmico a 42° C durante 1.5 min e inmediatamente se incubaron en hielo durante dos min. Se agregó 1 mL de medio LB y se incubó a 37° C en agitación durante 1 hora. Terminada la incubación se tomaron 50-300 μ L y se distribuyeron sobre una placa con medio LB-agar con ampicilina (100 μ g/mL) para las células DH5 α y BL21(DE3) o ampicilina (100 μ g/mL) más cloranfenicol (30 μ g/mL) para el caso de las células BL21(DE3)pLysS. Posteriormente las placas se incubaron a 37° C durante 16 horas o toda la noche (Sambrook and Rusell, 2001).

7.7. Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina

Se realizaron cultivos de 10 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) o ampicilina más cloranfenicol (30 μ g/mL) (según sea el caso para las bacterias de las que se extrae el ADN) inoculados con una colonia bacteriana resistente al antibiótico de selección y se incubaron toda la noche a 37° C en agitación a 250 rpm. Al siguiente día, los cultivos se centrifugaron a 8,500 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 200 μ L 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, se adicionaron 400 μ L de la solución de lisis II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) preparada al momento y el tubo se mezcló invirtiéndolo de 3-5 veces. Se agregaron 300 μ L de la solución de lisis III (Acetato glacial 5M, Acetato potásico 5M) y se mezcló la solución del mismo modo que en el paso anterior. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante para luego incubarlo con 10 μ g/mL de ARNasa A (*Sigma* Cat. No. R4875) a 37° C durante dos horas. Se agregó un volumen

igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló vigorosamente 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 y centrifugando a 12,000 rpm durante 10 min a 4° C. Después se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a 4° C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente (TA). Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µL de agua estéril o TE (Sambrook and Rusell, 2001).

7.8. Análisis de ADN por electroforesis

El análisis de ADN total y plasmídico se realizó mediante electroforesis utilizando geles de agarosa al 1% con TBE 0.5X (Tris-Borato 0.045 M, EDTA 1mM pH 8.0), los cuales se corrieron en cámaras electroforéticas utilizando como *buffer* de corrida TBE 0.5X. Las muestras de ADN se prepararon con *buffer* de muestra 1X (Azul de bromofenol 0.25%, Glicerol 30% y Xilencianol 0.25%) y se corrieron a 100 V durante 30 min. Terminada la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio y la imagen fue capturada con un fotodocumentador *MiniBIS Pro* (DNR Bio-Imaging Systems). Además, se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro *NanoDrop® One^c* (Thermo Scientific Cat. No. ND-ONE-W).

7.9. Inducción de *TcRBP-like* con IPTG

Para inducir la expresión de His-*TcRBP-like* se realizó un cultivo de 10 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (30 µg/mL), y una colonia de las bacterias BL21(DE3)pLysS con la construcción de His-*TcRBP-like*. El cultivo se dejó crecer durante toda la noche a 37° C en agitación a 250 rpm. Al día siguiente se hizo una ampliación a 500 mL de medio LB en una dilución 1:100, utilizando 5 mL del cultivo anterior. El cultivo ampliado se creció en las condiciones antes mencionadas hasta alcanzar la densidad óptica de

0.6 medida a 600nm, y una vez alcanzada esta densidad se indujo el cultivo con IPTG (Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosido) (0.1 mM) a 20° C en agitación a 250 rpm durante 5 horas. Pasado este tiempo, el cultivo se centrifugó a 8,500 rpm durante 10 min a 4° C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se congeló a -70° C.

Para inducir a GST-*TcRBP-like* se realizó también un cultivo de 10 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y una colonia de las bacterias BL21(DE3) con la construcción de GST-*TcRBP-like*. El cultivo se dejó crecer toda la noche a 30° C en agitación a 250 rpm. Al día siguiente se hizo una ampliación a 500 mL de medio LB en una dilución 1:100. El cultivo ampliado se creció en las condiciones antes mencionadas hasta alcanzar la densidad óptica de 0.6 a 600nm, y una vez alcanzada esta densidad se indujo el cultivo con IPTG (0.5 mM) a 20° C en agitación a 250 rpm durante 1 hora. Pasado este tiempo, el cultivos se centrifugó a 8,500 rpm durante 10 min a 4° C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se congeló a -70° C para su uso posterior.

7.10. Purificación de *TcRBP-like* con perlas de sefarosa

Antes de utilizar las perlas de sefarosa, estas fueron lavadas, para lo cual se tomó 1 mL de las perlas de Ni-Sefarosa (*GE-Healthcare* Cat. No. 17-5318-01) para purificar a His-*TcRBP-like*, y de las perlas de Glutación-Sefarosa (*GE-Healthcare* Cat. No. 17075601) para purificar a GST-*TcRBP-like*, en un tubo falcon de 15 mL. Se centrifugó a 500 G durante 5 min a 4° C y luego de retirar el sobrenadante, se dio un lavado a las perlas con 2.5 mL de agua estéril, centrifugando en las mismas condiciones. Se retiró nuevamente el sobrenadante y se agregaron 2 mL de *buffer* de unión 1X (para Ni-Sefarosa (His-*TcRBP-like*): NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 30 mM, pH 7.4; para Glutación-Sefarosa (GST-*TcRBP-like*): PBS 1X pH 7.3), centrifugando y retirando el sobrenadante. Por último, se aforaron las perlas a 1 mL con el mismo *buffer* de unión, y de este modo pudieron éstas interactuarse con las muestras a purificar.

Las pastillas previamente generadas en la inducción de las proteínas recombinantes se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 5 mL de *buffer* de unión 1X (el mismo utilizado para lavar las perlas) e inhibidor de proteasas 1X *cOmplete®* (*Sigma-Aldrich* Cat. No. 10618200). Se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación alternando el tubo con la muestra en hielo seco y etanol / baño a 37° C. Se agregó lisozima (10 mg/mL) a las muestras y se sonicaron 1 min, 10 s ON/OFF con 50% de amplitud, hasta que las muestras se observaron disgregadas vistas al microscopio. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 8,500 rpm durante 30 min a 4° C y la fracción soluble (sobrenadante) se interaccionó con las perlas de sefarosa antes lavadas. La interacción de las muestras a purificar y las perlas se llevó a cabo durante toda la noche a 4° C en agitación.

Al día siguiente, se centrifugaron los tubos con las perlas-proteína a 8,500 rpm, 10 min a 4° C y se separó la fracción soluble no unida a las perlas, para su posterior análisis en un Western blot. Las perlas fueron lavadas 5 veces con 1 mL *buffer* de unión 1X, centrifugando a 8,500 rpm, 10 min a 4° C y recuperando cada lavado para su análisis posterior. Luego se realizaron 6 eluciones de la proteína unida a las perlas con 0.5 mL de *buffer* de elusión 1X (para His-*TcRBP-like*: NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 500mM, pH 7.4; para GST-*TcRBP-like*: Tris-HCl 50 mM, Glutación reducido 10 mM, pH 8.0), dejando reposar a cada elusión por 10 min a TA y centrifugando después a 8,500 rpm, 10 min a 4° C. Cada elusión fue recuperada para su análisis posterior por *Western blot*.

7.11. Preparación de extractos para análisis *Western blot*

La fracción soluble no unida, los lavados y eluciones recuperados en la purificación antes realizada fueron preparados en una relación v/v con *buffer* de carga 2X (Tris 1M pH 6.8, SDS 10%, Glicerol, Azul de bromofenol, DTT, agua estéril) (Sambrook and Rusell, 2001). La fracción insoluble fue disuelta en 5 mL de *buffer* de unión 1X y preparada del mismo modo, así como las perlas que quedaron de la purificación. Las muestras se sometieron a

ebullición violenta por 5 min y se reposaron a TA antes de realizar el *Western blot*.

7.12. Análisis *Western blot*

Se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% (Sambrook and Rusell, 2001), corridos a 100 V por dos horas. Una vez separadas las muestras en los geles, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Bio-Rad* Cat. No. 162-0115) a 100 V por 1 hora. Se bloquearon las membranas con PBS 1X-Leche al 6% (*Svelty*) por dos horas en agitación constante. A continuación se descartó la solución de bloqueo y las membranas se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4° C en agitación constante. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-polihistidinas IgG producido en ratón (*Sigma* H1029), y anti-GST IgG producido en ratón (*Invitrogen* Cat. No. 136700) en una dilución 1:3,000 con PBS 1X-Leche al 6%. Posteriormente se realizaron lavados a las membranas con PBS 1X y se incubaron por dos horas a TA con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG (*Santa Cruz Biotechnology* Cat. No. A1014) conjugado con peroxidasa, producido en cabra. Por último, se realizaron tres lavados a las membranas y se revelaron mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (*Amersham* Cat. No. RPN2106) como sustrato de la peroxidasa (Sambrook and Rusell, 2001).

7.13. Línea celular

Se utilizó la línea celular de fibroblastos de riñón de mono LLC-MK2 (ATCC Número CCL-7™). Las células se cultivaron en cajas *Corning* de 60 X 15 mm de diámetro a una razón de pase de 1:10 con 3.5 mL de medio DMEM (por sus siglas en inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, *GIBCO*) complementado con 10% de SFB, 1% de glutamina y 5 mg/mL de penicilina-estreptomina (10,000 U/ μ L/mL en solución salina de NaCl al 0.85%), incubadas a 37° C en una atmósfera húmeda en presencia de CO₂ al 5% hasta

alcanzar una confluencia del 70%. Para su resiembra, la monocapa de células se lavó con 5 mL de PBS 1X-EDTA 0.53 M, posteriormente se adicionó 1 mL de tripsina-EDTA y se dejó a 37° C durante 5 min. La caja se agitó ligeramente para desprender las células, se tomaron 350 µL de la suspensión celular y se colocaron en una caja con 3.5 mL de medio DMEM complementado como se mencionó anteriormente, para mantener el cultivo.

7.14. Interacción de epimastigotes NM1-cl1 con fibroblastos LLC-MK2

Se interactuaron fibroblastos LLC-MK2 de riñón de mono (ATCC Número CCL-7™) al 80% de confluencia, en cajas *Corning* de 75 cm², con 3X10⁷ epimastigotes de la cepa NM1-cl1 en fase logarítmica de crecimiento y mantenidos en medio LIT a 28° C. Los parásitos fueron contados en la cámara de Neubauer y centrifugados a 3,500 rpm durante 10 min y se retiró el sobrenadante. Posteriormente, los parásitos fueron lavados con 5 mL de medio DMEM sin complementar centrifugándolos a 3,500 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de parásitos fue resuspendida en 1 mL de medio DMEM complementado con 2% de SFB y 0.5% de penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL en solución salina de NaCl al 0.85%), para ser agregada después al sobrenadante de las monocapas de células. Las interacciones células-parásitos se incubaron a 37° C en presencia de 5% de CO₂ con medio DMEM complementado con 2% de SFB, 1 % de glutamina y 5 mg/mL de penicilina-estreptomicina. A las 48 horas post interacción, los parásitos fueron recolectados y se procedió a la extracción de su ARN total.

7.15. Extracción de ARN total de epimastigotes NM1-cl1

El ARN total de epimastigotes de NM1-cl1 de *T. cruzi* estimulados por 48 horas con fibroblastos LLC-MK2, fue extraído utilizando el método de TRIzol (*GIBCO*) de acuerdo a las especificaciones del proveedor, con las siguientes modificaciones. Los parásitos se centrifugaron a 4,000 rpm durante 6 min para

obtener una pastilla que fue resuspendida en 100 μL de TRIzol. Posteriormente, se adicionó un volumen de cloroformo y se mezcló en vórtex por 15 s, se dejó a TA durante tres min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4° C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se adicionó 1.5 volúmenes de isopropanol frío y se dejó 10 min a TA. 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 TA durante aproximadamente 10 min, la muestra se resuspendió en H₂O-DEPC (Dietilpirocarbonato) y se cuantificó.

La integridad del ARN total fue determinada por electroforesis en un gel de agarosa ultra pura al 1.5% en TBE 1X con Tiocianato de Guanidina. Para la electroforesis, 0.5, 1 y 2 μg de ARN total se mezclaron con un volumen de formamida, la mezcla se calentó a 65° C durante 10 min e inmediatamente después se colocó en hielo por 5 min. Posteriormente el ARN total fue separado electroforéticamente a 100 V durante una hora. La integridad de los ARNs totales fue visualizada tiñendo con bromuro de etidio y se tomaron las imágenes en un fotodocumentador *MiniBIS Pro* (DNR Bio-Imaging Systems). Además, se cuantificó el ARN en un espectrofotómetro *NanoDrop® One^c* (Thermo Scientific Cat. No. ND-ONE-W), se alicuotó en tubos con 50 μg de ARN total y se almacenó a -70° C para su uso en el ensayo de ARN *pull-down*.

7.16. Ensayo de ARN *pull-down*

Para este ensayo, 50 μg de la proteína recombinante *TcRBP-like* purificada fue interaccionada con 100 μg de perlas de sefarosa (previamente lavadas como se indica en la purificación de *TcRBP-like* con perlas de sefarosa) durante toda la noche a 4° C en agitación constante. Posteriormente, las perlas con la proteína recombinante se pusieron en contacto con el ARN total de epimastigotes (50 μg por ensayo) en agitación durante dos horas a 4° C en 500 μL de *buffer* EMSA (HEPES 20 mM pH 7.0, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 3 mM, EDTA 0.4 mM, DTT 1 mM, Glicerol 20%, tratado con DEPC) y en la

presencia de inhibidor de proteasas 1X *cOmplete*[®] (*Sigma-Aldrich* Cat. No. 10618200) e inhibidor de ARNasas, *RNase OUT* (40 U/ μ L) (*Invitrogen*). Se realizaron tres lavados de las perlas con 500 μ L de *buffer* EMSA, centrifugando a 500 G por 5 min a 4^o C. En los lavados se colectaron a los ARNs no unidos a la proteína recombinante, dichos lavados fueron sometidos a una extracción de ARN por el método de TRIzol. Los ARNs que se unieron a la proteína fueron purificados con el método de TRIzol agregando el reactivo directamente a las perlas de sefarosa para liberar de ellas a la proteína recombinante y a los ARNs unidos, con estos últimos se generó ADNc de cadena sencilla y de doble cadena para clonarlos y secuenciarlos como se describe a continuación.

7.17. Ensayo de transcripción reversa

Se utilizó el kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (*Invitrogen* Cat. No. 18080-05) de acuerdo a las especificaciones del proveedor con las siguientes modificaciones. El ARN de epimastigotes NM1-cl1 capturado en los ensayos de ARN *pull-down*, fue usado como cadena molde para la obtención del ADN complementario (ADNc). El ARN fue tratado para eliminar la posible contaminación de ADN, para lo cual se precipitó y resuspendió en 25 μ L de H₂O-DEPC y se utilizó el kit *TURBO DNA-free*[®] (*Ambion* Cat. No. AM1907). Se agregó 2 μ L ADNasa Turbo (2 U/L) y 2.5 μ L de *buffer* 10X, incubando la muestra a 37^o C durante 30 min. Para inactivar a la enzima se utilizaron 2.5 μ L del reactivo inactivador de la ADNasa y se incubó la reacción a TA durante 5 min. El ARN fue precipitado con 1:10 de NaOAc 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, e incubado durante 30 min a -70^o C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4^o C y la pastilla se lavó tres veces con etanol al 75%, centrifugando a 12,000 rpm durante 5 min a 4^o C. Una vez eliminado el ADN contaminante, la síntesis del ADNc de cadena simple se llevó a cabo mezclando: 8 μ L de ARN, 1 μ L de dNTPs 10 mM y 1 μ L del oligonucleótido RDEdT (5' GCG GCG GAT CCT TTT TTT TTT TTT TT 3') 50 μ M y se incubó la reacción a 65^o C durante 5 min. Se añadieron 10 μ L de la mezcla de síntesis de ADNc (2 μ L de *Buffer* RT 10X,

4 μL de MgCl_2 25 mM, 2 μL de DTT 0.1 M, 1 μL de *RNAseOUT* de 40 U/ μL y 1 μL de *SuperScript III RT* de 200 U/ μL) realizada con el kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (*Invitrogen* Cat. No. 18080051) y se incubó la muestra a 50° C durante 50 min para llevar a cabo la síntesis del ADNc de cadena sencilla. Posteriormente la reacción se incubó a 85° C por 5 min para terminar la reacción. Se removió el ARN del híbrido ARN/ADN, añadiendo 1 μL de ARNasa H (2 U/ μL) e incubando la muestra a 37° C durante 20 min. A partir de este producto se llevó a cabo la síntesis del ADNc de cadena doble por PCR, como se describe a continuación.

7.18. Ensayo de PCR para generar ADNdc

Para amplificar el ADNdc a partir de ADNc de cadena sencilla de parásitos NM1-cl1, se utilizó la enzima *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (*Invitrogen* Cat. No. 11304-011). Para realizar esta reacción se usó como templado el ADNc (3 μL) obtenido en el ensayo de transcripción reversa y se agregó: 5 μL de *buffer Platinum Taq* 10X, 2 μL de MgSO_4 50mM, 8 μL de dNTPs 1.25 mM, 1 μL de los oligonucleótidos RDE-dT y RDE-ME 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (5' GCG GCG GAT CCA **CAG TTT CTG TAC TAT ATT G** 3') el cual contiene la secuencia del mini exón (en negritas) que está presente en el extremo 5' de todos los ARNm(s) de *T. cruzi*. Se llevó la reacción a un volumen final de 50 μL con H_2O -DEPC. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 94° C/5 min, 35 ciclos a 94° C/30 s, 55° C/30 s, 68° C/2 min y 1 ciclo final a 68° C/5 min. Posteriormente se verificó la obtención del amplificado en un gel de agarosa como se describió en el análisis de ADN por electroforesis, y el ADNdc se almacenó a -20° C para su posterior uso.

7.19. Identificación de transcritos unidos a TcRBP-like de *T. cruzi* en ensayos de ARN *pull-down*

Los ADNdc obtenidos en la PCR luego del ensayo de ARN *pull-down*, fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (*Promega* Cat. No. A1360) según

las especificaciones del proveedor. De las colonias positivas, se extrajo ADN plasmídico con el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen Cat. No. 27104) y se envió a secuenciar utilizando el oligonucleótido SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3') localizado río arriba del inserto (secuenciación realizada en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la UNAM). Posterior a la secuenciación, se identificaron y analizaron las secuencias de los transcritos unidos a *TcRBP-like*, sus proteínas predichas y la función biológica anotada para cada secuencia en las bases de datos *TriTrypDB* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), *ExpASy SIB Bioinformatics Resource Portal* (<https://www.expasy.org/>) y *NCBI National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

VIII. RESULTADOS

8.1. Análisis *in silico* de *TcRBP-like* de *T. cruzi*

Con el fin de predecir algunas características de *TcRBP-like*, que nos aportaran un primer acercamiento al estudio de esta proteína, se realizó un análisis *in silico* (simulación por computadora) utilizando varios tipos de software bioinformático.

El análisis *in silico* de *TcRBP-like* se llevó a cabo con la secuencia de la RBP putativa con el número de acceso TCSYLVIO_006186 de la cepa Sylvio X-10 de *T. cruzi* (DTU TcI). Esto debido a que se utilizó esta cepa como referencia para identificar a los genes obtenidos en el análisis de la expresión diferencial entre las cepas NM1-cl1 y Cl2-cl2, que también pertenecen al DTU TcI. Por lo tanto se esperaba que la secuencia de la RBP reportada en la cepa Sylvio X-10 tenga mayor identidad con *TcRBP-like* de la cepa NM1-cl1, la cual aún no ha sido secuenciada.

Los resultados obtenidos indican que la secuencia en estudio no ha sido asignada a un cromosoma específico. La longitud de su transcrito es de 1149 pb que codifican para una proteína de 382 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 41.281 KDa y un punto isoeléctrico teórico de 9.09-9.31.

TcRBP-like de *T. cruzi* cuenta con algunos ortólogos en tripanosomátidos (**Tabla 3**). En *T. cruzi*, estos ortólogos se localizan en las cepas Dm28c (TCDM_02352), CL Brener (haplotipo no-Esmeraldo-*like*) (TcCLB.511277.200) y marinkellei (Tc_MARK_4895). Los ortólogos en las cepas Dm28c y CL Brener resultan ser particularmente similares a *TcRBP-like* ya que presentan una cobertura de la secuencia de TCSYLVIO_006186 del 100% y su identidad es del 99%. En el caso de la cepa marinkellei la cobertura es menor, de 89%, y su identidad es del 96%. También se identificaron ortólogos de *TcRBP-like* en otros tripanosomátidos como *T. rangeli* (TRSC58_01751), *T. grayi* (Tgr.1129.1010), *T. brucei* TREU927 (Tb927.10.13540), *T. brucei* gambiense (Tbg972.10.16360), *T. congolense*

(TcII3000_10_11630) y *T. vivax* (TvY486_1013130). Todos estos casos presentan una cobertura de la secuencia de TCSYLVIO_006186 desde 45% hasta 100%, aunque su identidad resulta menor que con ortólogos de *T. cruzi*, siendo de 44% a 81%. Estos resultados muestran que las secuencias provenientes de la misma especie de TCSYLVIO_006186 (*T. cruzi*) presentan una mayor cobertura de la secuencia así como una mayor identidad, que cuando se comparan con ortólogos provenientes de otros tripanosomas.

El análisis de ortología tiene como principal objetivo determinar la ancestría entre especies diferentes, pero además también puede servir para predecir la función de una proteína, siempre y cuando se conozcan las funciones de sus ortólogos. En el caso de *TcRBP-like*, no es posible asignarle una función, ya que ninguno de los ortólogos obtenidos en este análisis ha sido caracterizado, y al igual que *TcRBP-like* se les considera como RBPs putativas.

Nombre de la secuencia	Organismo	Tipo de proteína	% de cobertura de la secuencia TCSYLVIO_006186	% de identidad con TCSYLVIO_006186
TCDM_02352	<i>Trypanosoma cruzi</i> Dm28c	Proteína de unión al ARN, putativa	100%	99%
TcCLB.511277.200	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener no-Esmeraldo-like	Proteína de unión al ARN, putativa	100%	99%
Tc_MARK_4895	<i>Trypanosoma cruzi</i> marinkellei cepa B7	Proteína de unión al ARN, putativa	89%	96%
TRSC58_01751	<i>Trypanosoma rangeli</i> SC58	Proteína de unión al ARN, putativa	100%	81%

Tgr.1129.1010	<i>Trypanosoma grayi</i> ANR4	Proteína de unión al ARN, putativa	100%	61%
Tb927.10.13540	<i>Trypanosoma brucei</i> TREU927	Proteína de unión al ARN, putativa (RBP12)	81%	44%
Tbg972.10.16360	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> DAL972	Proteína de unión al ARN, putativa	81%	44%
TcIL3000_10_11630	<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000	Proteína de unión al ARN, putativa	45%	58%
TvY486_1013130	<i>Trypanosoma vivax</i> Y486	Proteína de unión al ARN, putativa	64%	45%

Tabla 3. Ortólogos de *TcRBP-like* en tripanosomátidos. Dicha proteína cuenta con varios ortólogos en diferentes cepas de *T. cruzi* y en otros tripanosomátidos. En todos los casos, las secuencias corresponden a proteínas de unión al ARN, aún reportadas como putativas. Tabla obtenida de *TriTrypDB* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

La secuencia de la RBP putativa *TcRBP-like*, además de contar con ortólogos en tripanosomátidos, tiene similitud con los transcritos de algunas proteínas de otros organismos, tales como *Homo sapiens* y *Drosophila melanogaster*. Una particularidad de estas proteínas es que cuentan con el mismo dominio de unión al ARN tipo RRM, el cual también está presente en *TcRBP-like* (como se muestra más adelante, en la **Figura 7** y la **Figura 8**). La identidad de las secuencias de estas proteínas con la secuencia de TCSYLVI0_006186, se encuentra en el rango de 38% al 44% (**Tabla 4**). Aun cuando este porcentaje de identidad no es tan alto como el observado con los ortólogos en los tripanosomátidos, sí resulta importante ya que podría ayudar

a sugerir la posible función de *TcRBP-like*, debido a que en *H. sapiens* y *D. melanogaster* se sabe que estas proteínas mostradas en la **Tabla 4** participan en procesos de *splicing* y como represores traduccionales de algunos mensajeros. Por lo tanto la función de *TcRBP-like* podría ser similar.

Nombre de la proteína y descripción	Organismo	Dominio de unión al ARN	% de identidad con TCSYLVIO_006186
Bruno-like 4. Proteína de unión al ARN	<i>Homo sapiens</i>	RRM	44
Bruno-like 5. Proteína de unión al ARN	<i>Homo sapiens</i>	RRM	40
Bruno-like 6. Proteína de unión al ARN	<i>Homo sapiens</i>	RRM	40
CUGBP. Miembro 1 de la familia Elav-like	<i>Homo sapiens</i>	RRM	38
CUGBP. Miembro 2 de la familia Elav-like	<i>Homo sapiens</i>	RRM	41
Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas A2/B	<i>Homo sapiens</i>	RRM	40
SEX-LETAL PROTEIN	<i>Drosophila melanogaster</i>	RRM	38

Tabla 4. Similitud de TCSYLVIO_006186 con transcritos de proteínas de *Homo sapiens* y *Drosophila melanogaster*. Todas estas secuencias corresponden a RBPs previamente caracterizadas, con motivos RRM que les permiten la interacción con el ARN. Tabla obtenida de *TriTrypDB* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

TcRBP-like de *T. cruzi*, se considera una RBP putativa porque en su secuencia tiene un único motivo de unión al ARN conservado del tipo RRM (Clery et al., 2008) (**Figura 7**) (**Figura 8**), con el cual podría interaccionar con los transcritos de la célula. Este motivo está formado por 81 residuos de aminoácidos, que representa una longitud característica para este dominio de unión al ARN (entre 70 y 90 aminoácidos).

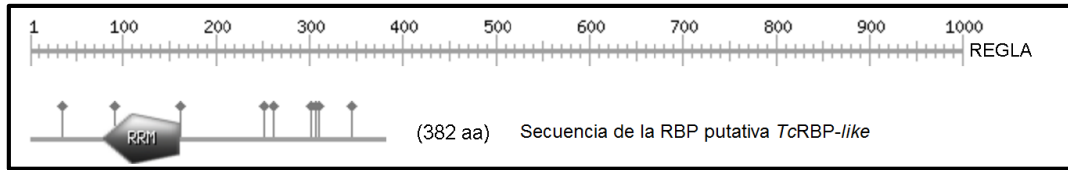


Figura 7. Motivo RRM en *TcRBP-like* de *T. cruzi*. En la estructura de *TcRBP-like* de *T. cruzi* hay un motivo de reconocimiento de ARN (RRM) que es conservado en otras proteínas de unión al ARN. En la figura, se observa dicho motivo en forma de un pentágono gris. Análisis obtenido de *ExpASy SIB Bioinformatics Resource Portal. Scan Prosite* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>).

MOTIVO RRM EN LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA *TcRBP-like* de *T. cruzi*

MNYAAVINGPFPSSNNGNHHYSRLGYTPNGYGPQPNTTEQNPQMPVYQTFNSAAGQPVNVY
 QQIPPTSASRDPRTNIHIG**SKL****FVGQVP****AMTTEEQLRPVFE****PYGELLEVKIMRDP****LGRSK**
GSAWVRYET**NEMAMNAINALHEKHTVPPQTNPLRVQFAT****PNSVRHQQLQARYAVELKVPM**
 NQYNFGGQMGGGTQQSGMVMRLRSGASPNVVPPI SANVGGRYMSAPFGGGPMESSSIMSGP
 YTSSANCFDGVNSSGNRRDLYSPLEQPQGTAPQLYQQQQQQRGGFSSPVVTPPSVYNQAP
 STRQPTARNNTKSGGGISTGSFETGHGMVNPNSNGAPTMANEMSTLDAGIALWEARNNN
 GLQGQEPREAAARVRSGERKEE

Figura 8. Secuencia de aminoácidos del motivo RRM en *TcRBP-like* de *T. cruzi*. La secuencia de aminoácidos del motivo RRM se indica en letras azules, dentro de la secuencia total de aminoácidos de *TcRBP-like* de *T. cruzi*. En letras rojas se destacan las secuencias RNP2 y RNP1 (en orden de aparición), por medio de las cuales se lleva a cabo la unión con el ARN. El motivo RRM en esta proteína consta de 81 aminoácidos, que comprenden desde el aminoácido 70 hasta el 151, dentro de la secuencia completa de 382 aminoácidos. Análisis obtenido de *ExpASy SIB Bioinformatics Resource Portal. Scan Prosite* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>).

El motivo de reconocimiento de ARN (RRM) es un motivo conservado que se localiza en *TcRBP-like* de *T. cruzi*, pero también en otras proteínas de unión al ARN en diversas especies como *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *H. sapiens*, *Leishmania major* y *T. brucei*, con las cuales presenta una identidad del 25% al 87.34% (**Figura 9**). Con *A. thaliana* se observó la identidad más baja, mientras que con *T. brucei* se observó la identidad más alta. La mayor similitud de estos motivos se localiza en las secuencias RNP1 y RNP2, que es una característica de los motivos

RRM, ya que por medio de estos sitios se lleva a cabo la unión del ARN y son regiones muy conservadas, aún entre especies diferentes. Como era esperado, la identidad del motivo RRM es mayor entre los tres tripanosomátidos más estudiados (*L. major*, *T. cruzi* y *T. brucei*) que pertenecen a la misma familia (*Trypanosomatidae*), comparado con los otros organismos con los cuales *T. cruzi* no comparte ancestría directa. De hecho, la identidad con *L. major* es del 75.31%, mientras que con *T. brucei* es aún mayor, lo que concuerda con el hecho de que *T. brucei* y *T. cruzi* son los dos clados del género *Trypanosoma* y por lo tanto, están estrechamente relacionados.

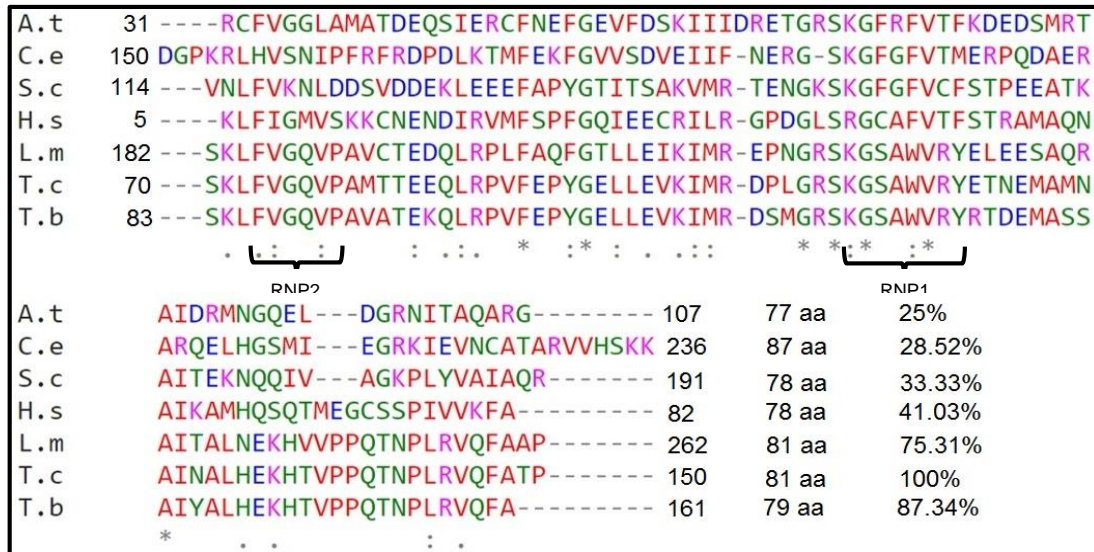


Figura 9. Alineamiento del motivo de reconocimiento de ARN (RRM) en diversos organismos. El alineamiento fue realizado con el motivo RRM de *TcRBP-like* de *T. cruzi* (T.c) y otras especies como *Arabidopsis thaliana* (A.t), el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (C.e), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (S.c), *Homo sapiens* (H.s), *Leishmania major* (L.m) y *T. brucei* (T.b). Se muestran además los sitios correspondientes a las secuencias RNP1 y RNP2, características de los motivos RRM y que conforman los sitios de unión al ARN. Al final de cada secuencia se indican los porcentajes de identidad de cada motivo con respecto al motivo RRM en la proteína *TcRBP-like* de *T. cruzi*. Los colores de los aminoácidos en la figura representan al grupo de residuos al que pertenecen, en rojo se encuentran los aminoácidos apolares (P, L, V, I, F, M, A, W), en verde los aminoácidos polares neutros (sin carga) (N, H, G, Q, S, T, Y, C), en azul los aminoácidos polares ácidos (D, E), y en lila los aminoácidos polares básicos (K, R). Secuencias tomadas de (Kramer et al., 2014; Kuwasako

et al., 2014; Lorkovic and Barta, 2002). Análisis obtenido de *Clustal Omega. Multiple Sequence Alignment. EMBL-EBI* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Dado que no existen antecedentes en los que se haya caracterizado a *TcRBP-like* o a sus ortólogos, no se cuenta con una predicción de su estructura secundaria, ni de la estructura terciaria. Sin embargo, el análisis bioinformático realizado permite determinar estas estructuras por la homología que posee la secuencia en estudio con otras secuencias cuya estructura ya ha sido comprobada previamente. De este modo, se estableció primero la estructura secundaria de *TcRBP-like* (**Figura 10**), en la que se pueden apreciar las hélices α y las cadenas β que conforman a la proteína. La región en donde se localiza el motivo RRM es más fácil de predecir dado que se trata de una secuencia muy conservada.

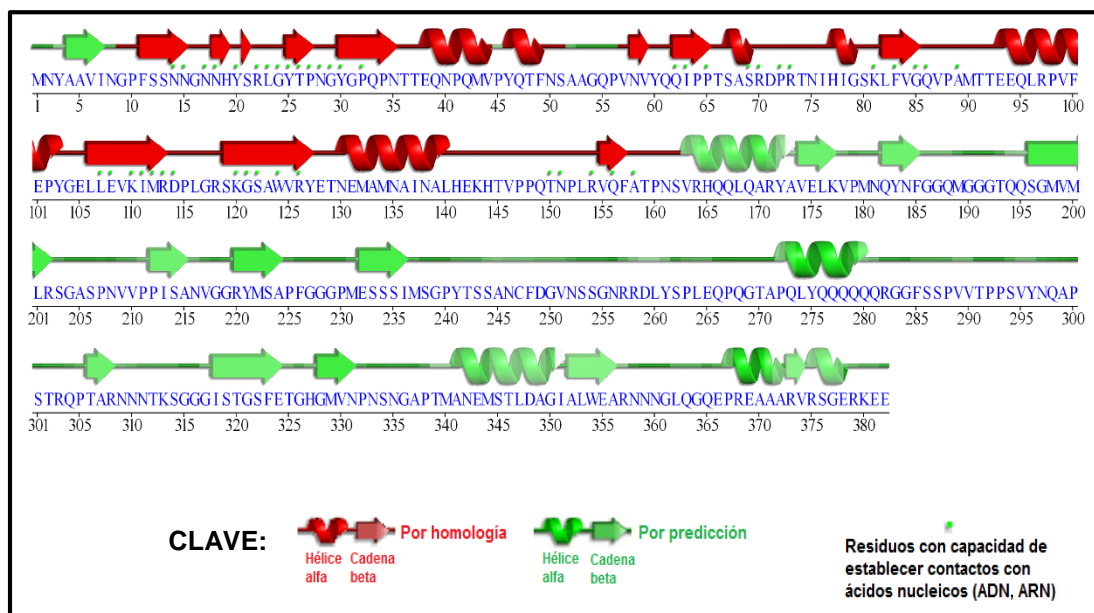


Figura 10. Estructura secundaria probable de *TcRBP-like* de *T. cruzi*. En letras azules se indica la secuencia de 382 aminoácidos de *TcRBP-like*. Las estructuras en color rojo son regiones calculadas por homología con otras proteínas conocidas con al menos 30% de identidad de secuencia y que alinean con al menos $\frac{3}{4}$ partes de la secuencia de nucleótidos de *TcRBP-like*, por lo que se tiene mayor certeza de su estructura. En esta zona se localiza el RRM de *TcRBP-like* (del aminoácido 70 al 151). Las estructuras en color verde se obtienen por predicción bioinformática y no están comparadas con otras proteínas. Cuando el color verde es más tenue, menor es la certeza de la predicción. En puntos verdes pequeños

se indican algunos aminoácidos que podrían unirse a ácidos nucleicos (el programa no puede discernir entre uniones de ADN o de ARN). Varios de estos puntos se pueden ver en la región donde se localiza el motivo RRM, como se espera. Análisis obtenido de SAS (*Sequence Annotated by Structure*) (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/>).

La estructura tridimensional probable de *TcRBP-like* de *T. cruzi*, se puede establecer a través de un modelado por homología con otras proteínas de secuencia similar (**Figura 11**). Una de las proteínas que presenta mayor identidad de secuencia (41%) con *TcRBP-like* de *T. cruzi* y que cuenta con el análisis de cristalografía correspondiente es CUGBP, miembro 2 de la familia de proteínas *Elav-like* de *H. sapiens*. Eso se puede corroborar también en los resultados mostrados en la **Tabla 4** donde se presentan proteínas de *H. sapiens* y de *D. melanogaster* cuyos transcritos tienen similitud con la proteína en estudio. En esa tabla aparece CUGBP 2 como una de las proteínas que tiene identidad con *TcRBP-like* y que también presenta motivos RRM. Lo mismo se observa en la **Figura 9**, donde se realiza un alineamiento de varios RRM y en donde el RRM alineado de *H. sapiens*, corresponde a uno de los tres motivos que posee CUGBP2. Ambos análisis coinciden en que la identidad de *TcRBP-like* y de CUGBP2 es del 41%, por lo que se utilizó su estructura tridimensional ya conocida para sugerir la estructura tridimensional de *TcRBP-like*.

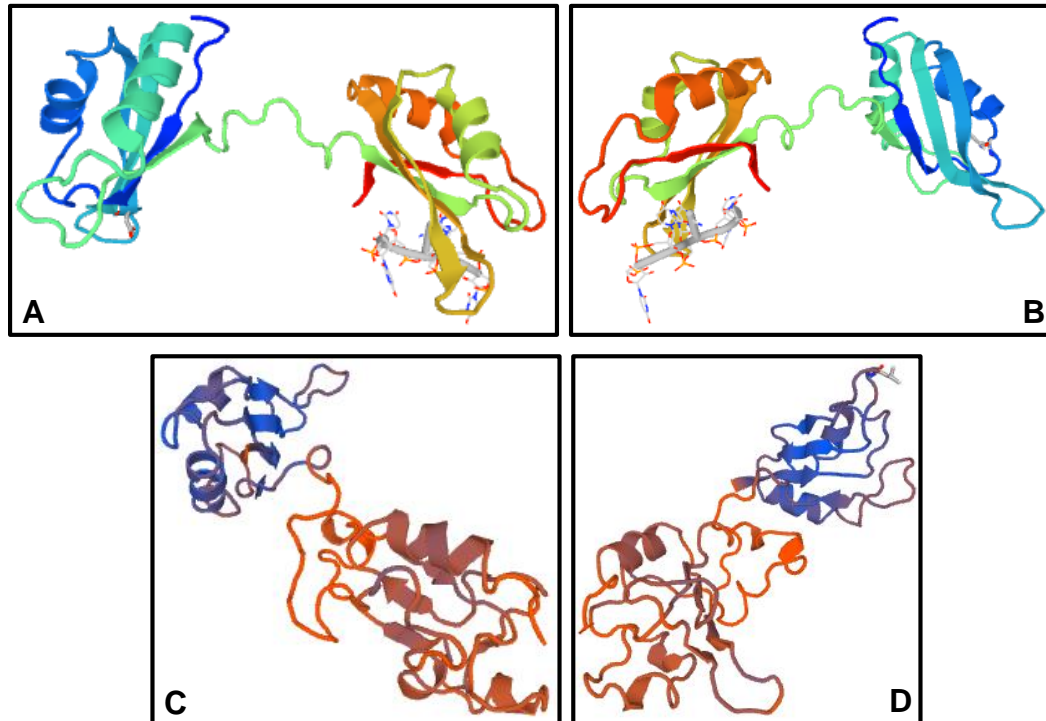


Figura 11. Estructura tridimensional probable de *TcRBP-like* de *T. cruzi*.

Dicha estructura fue obtenida por medio de un modelado por homología de estructura, con la RBP CUGBP de humano, miembro 2 de la familia *Elav-like* (A y B). De esta proteína se cuenta con la estructura cristalográfica de sus motivos RRM 1 y RRM 2, pero aún no se tiene la estructura completa ya que la proteína cuenta con un tercer motivo RRM. Además, en A y B se muestra una visión estructural del reconocimiento del ARN, realizado por los dominios RRM en la proteína CUGBP2. Las figuras C y D muestran la estructura probable de *TcRBP-like* de *T. cruzi*, en azul se observa a su único motivo RRM y en naranja se ve el resto de la proteína hasta su región carboxilo terminal. Análisis obtenido de *ExpPASy SIB Bioinformatics Resource Portal. Swiss Model* (<https://swissmodel.expasy.org>).

Otra característica de interés usualmente buscada en un análisis *in silico* es la localización de la proteína en estudio. Ya que se sabe que las RBPs pueden participar en el procesamiento del ARN, en su estabilidad, o en su transporte desde el núcleo al citoplasma, la RBP requiere evidentemente localizarse en el núcleo para llevar a cabo su función. Por el contrario, si la RBP participa en la eficiencia de la traducción, su localización debería ser citoplásmica. Por lo tanto, conocer su posible localización nos brindaría además una aproximación del papel que *TcRBP-like* podría desempeñar en la

célula, dejando claro que esto se tendría que confirmar en experimentos futuros.

Con un programa bioinformático buscamos secuencias de localización nuclear dentro de la secuencia de *TcRBP-like*, para estimar si ésta puede o no encontrarse en el núcleo o ser importada o exportada de este organelo. De no contar con secuencias de este tipo, se puede pensar que la proteína permanece en el citoplasma celular. En la **Figura 12** se observa el resultado de este análisis. No encontramos en la secuencia de *TcRBP-like* señales de localización nuclear canónicas, ni señales de exporte o importe nuclear, lo que sugiere que esta proteína se localiza en el citoplasma celular, sugiriendo a su vez, que puede poseer una función limitada al citoplasma como en la regulación de la traducción de algunas mensajeros, por citar un ejemplo.

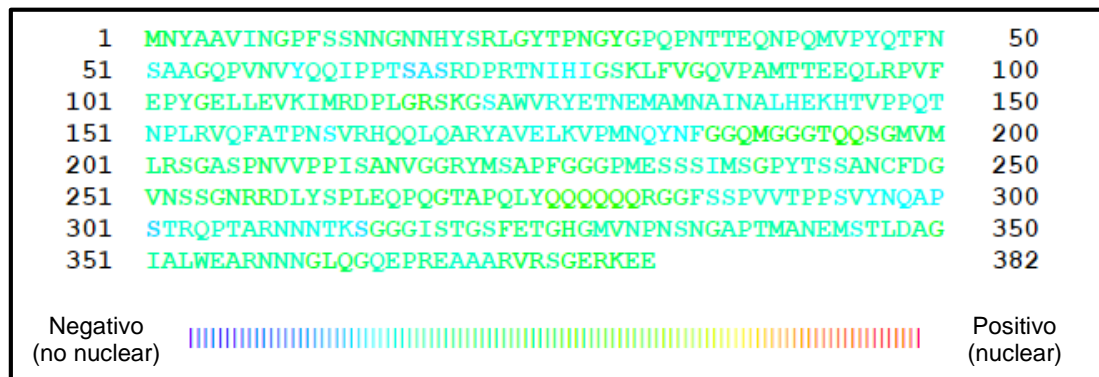


Figura 12. Búsqueda de señales de localización nuclear en *TcRBP-like* de *T. cruzi*. Se muestra la secuencia completa de *TcRBP-like* de *T. cruzi*, con 382 aminoácidos. En la parte inferior de la figura se localiza una escala de colores, en la cual el color rojo indica una zona de la proteína con alta probabilidad de tener una señal de localización nuclear, mientras que el color azul resulta negativo para una señal de este tipo. La secuencia en estudio presenta sólo los colores azul y verde, por lo que se considera improbable que se localice en el núcleo. Análisis obtenido de *Stockholm Bioinformatics Center. NucPred* (www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/).

Ya que las modificaciones post-traduccionales tienen un impacto importante en la función de las proteínas, procedimos a realizar un análisis *in silico* de *TcRBP-like* para localizar sitios putativos de modificaciones post-

traduccionales (**Tabla 5**). Las modificaciones post-traduccionales pueden tener funciones diversas y son uno de los procesos finales de la síntesis de proteínas siendo uno de los pasos involucrados en la expresión génica de una célula. Cada modificación realizada en una proteína puede dirigir a la misma a una función diferente.

Los resultados mostraron que *TcRBP-like* podría sufrir N-glicosilaciones, N-miristoilaciones y fosforilaciones con caseína cinasa II y con proteína cinasa C (**Tabla 5**). Sin embargo, no sabemos si se realizan estas modificaciones en la proteína dentro del parásito, y qué función podría tener esto.

Modificación post-traducciona	Posición de la modificación en la secuencia proteica	Aminoácidos en los que sucede la modificación	
N-Glicosilación	35-38	NTTE	
	252-255	NSSG	
	310-313	NNTK	
N-Miristoilación	54-59	GQpvNV	
	85-90	GQvpAM	
	186-191	GGqmGG	
	187-192	GQmgGG	
	192-197	GTqqSG	
	204-209	GAspNV	
	250-255	GVnsSG	
	315-320	GGgiST	
	316-321	SSisTG	
	317-322	GIstGS	
Fosforilación por caseína cinasa II	91-94	TteE	Por proteína treonina cinasa
	262-265	SplE	Por proteína serina cinasa
	345-348	StID	Por proteína serina cinasa
	162-164	SvR	Por proteína serina cinasa
Fosforilación por proteína cinasa C	162-164	SvR	Por proteína serina cinasa
	301-303	StR	Por proteína serina cinasa

	306-308	TaR	Por proteína treonina cinasa
--	---------	-----	---------------------------------

Tabla 5. Modificaciones post-traduccionales putativas de *TcRBP-like* de *T. cruzi*. Tabla obtenida de *ExpASY SIB Bioinformatics Resource Portal. Scan Prosite* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>).

Según los resultados del análisis *in silico* realizado a *TcRBP-like*, hay evidencias que sugieren que esta secuencia podría corresponder a una RBP de *T. cruzi*. Sin embargo, estas predicciones deben comprobarse experimentalmente por lo que procedimos a realizar un ensayo de ARN *pull-down*.

8.2. Ensayo de ARN *pull-down*

Para demostrar si *TcRBP-like* es una RBP, se llevaron a cabo ensayos de ARN *pull-down* utilizando a la proteína recombinante de *TcRBP-like* unida a la bandera de His o de GST y ARN total de epimastigotes de la cepa NM1-cl1 expuestos al estímulo de infección (interacción de los parásitos con fibroblastos LLC-MK2 durante 48 horas), como se describe en Materiales y Métodos.

Para obtener la proteína recombinante, la secuencia de *TcRBP-like* se fusionó a la secuencia de His y a la de GST, usadas como banderas, ya que se sabe que algunas proteínas se expresan mejor fusionadas a una u otra bandera, por lo que generamos ambas proteínas recombinantes.

Para iniciar con estos experimentos, primero se estandarizaron las condiciones óptimas de inducción de la expresión de la proteína recombinante His-*TcRBP-like* y GST-*TcRBP-like*, realizando curvas de temperatura, tiempo y concentración del inductor IPTG. Los resultados mostraron que las condiciones óptimas de expresión de His-*TcRBP-like* fueron crecer las bacterias BL21(DE3)pLysS transformadas toda la noche a 37° C y posteriormente inducir a 20° C durante 5 horas con 0.1 mM de IPTG. Para el

caso de GST-*TcRBP-like*, las bacterias BL21(DE3) transformadas se crecieron toda la noche a 30° C y se indujeron a 20° C por una hora con 0.5 mM de IPTG (datos no mostrados).

Posteriormente se determinó la expresión de la proteína recombinante y la fracción celular en donde se encontraba, utilizando ensayos de *Western blot*. Se identificó a la proteína His-*TcRBP-like* en el peso molecular esperado de ~44.281 KDa, considerando que la bandera de His tiene un peso de ~3 KDa y *TcRBP-like* pesa 41.281 KDa. Así mismo se identificó a la proteína GST-*TcRBP-like* en el peso molecular esperado de 67.281 KDa, correspondiente a la bandera de GST que tiene un peso de 26 KDa y *TcRBP-like* de 41.281 KDa. En el caso de ambas proteínas se observó su presencia tanto en el extracto total, como en la fracción soluble e insoluble (**Figura 13**), obteniéndose la proteína recombinante soluble en suficiente cantidad para llevar a cabo los ensayos de ARN *pull-down*.

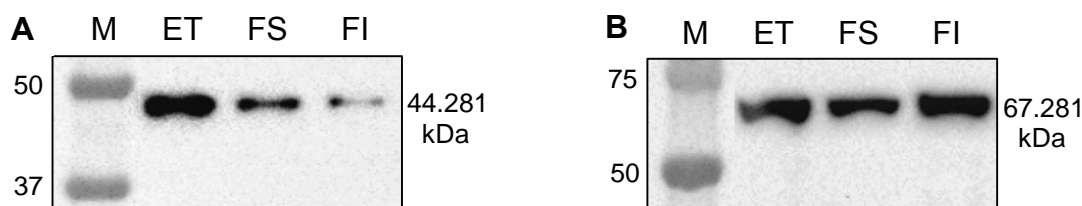


Figura 13. Identificación de la expresión de las proteínas recombinantes de *TcRBP-like* por Western blot. A) His-*TcRBP-like* reconocida con anticuerpo anti-poli-histidinas. B) GST-*TcRBP-like* reconocida con anticuerpo anti-GST. M: Marcador de peso molecular. ET: Extracto Total Proteico. FS: Fracción soluble. FI: Fracción insoluble.

Las proteínas recombinantes His-*TcRBP-like* y GST-*TcRBP-like* se unieron a las perlas de sefarosa-Ni (Níquel) y sefarosa-GSH (Glutati6n) respectivamente y se recuperaron las fracciones no unidas a las perlas, y se realizaron 5 lavados y 6 elusiones, para su análisis por *Western blot* determinando con este experimento cuál de las proteínas recombinantes se obtenía en mejores condiciones de pureza y cantidad. Como se muestra en la **Figura 14**, la proteína recombinante His-*TcRBP-like* se obtuvo en mejor

cantidad y pureza, por lo que decidimos utilizarla (específicamente la elusión 6) para los experimentos posteriores (**Figura 14, panel A y panel B**).

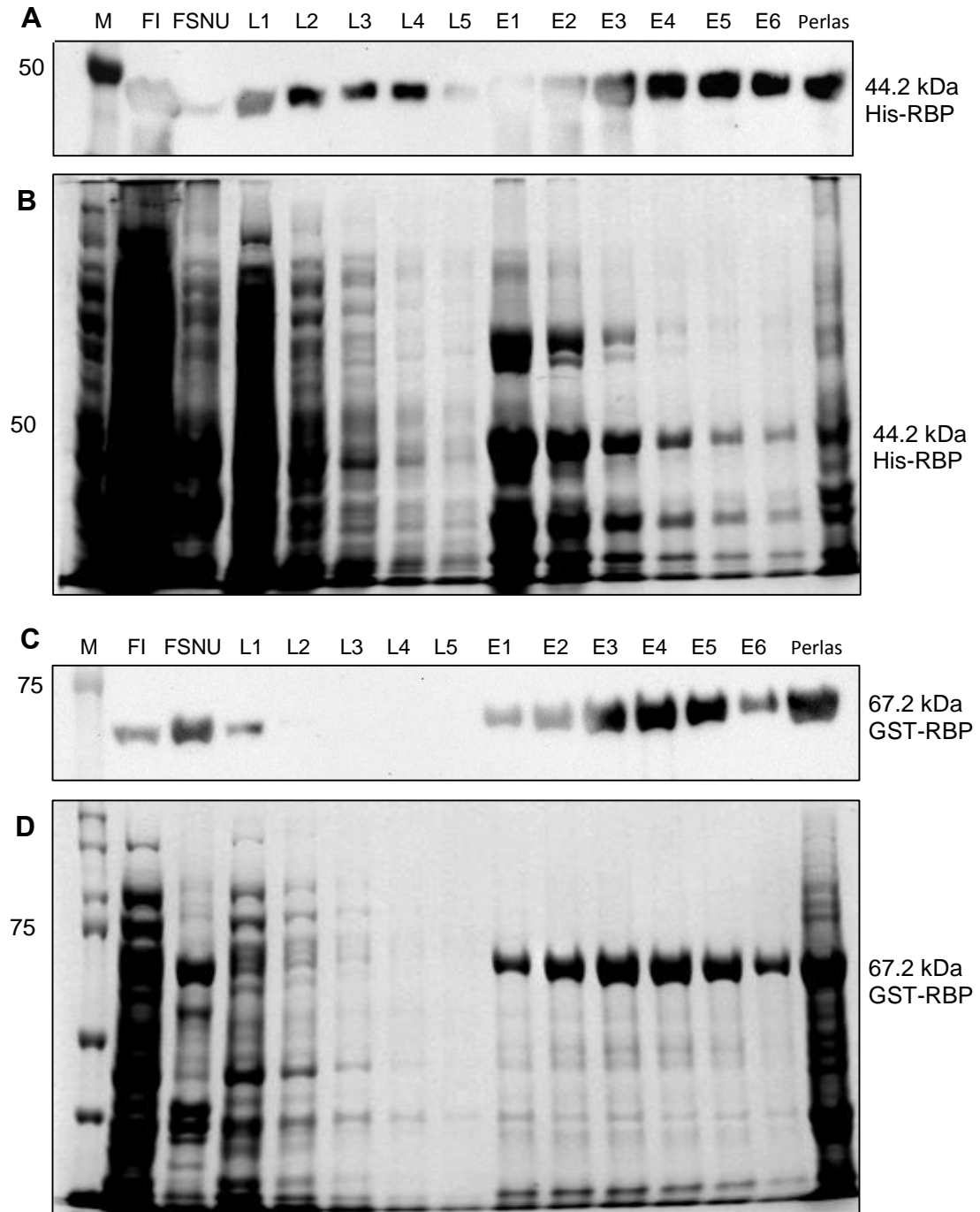


Figura 14. Purificación de las proteínas recombinantes de *TcRBP-like*. **A)** Western blot de His-*TcRBP-like* purificada con perlas de Ni-Sepharosa y reconocida con anticuerpo anti-polihistidinas. **B)** Electroforesis de las muestras purificadas de His-*TcRBP-like*

en un gel teñido con azul de Coomasie. **C)** Western blot de GST-*TcRBP-like* purificada con perlas de sefarosa y GSH y reconocida con anticuerpo anti-GST. **D)** Electroforesis de las muestras purificadas de GST-*TcRBP-like* en un gel teñido con azul de Coomasie. M: Marcador de peso molecular. FI: Fracción insoluble. FSNU: Fracción soluble no unida. L1-L5: Lavados 1-5. E1-E6: Eluciones 1-6.

También podíamos haber utilizado la proteína GST-*TcRBP-like*, ya que se observa en buena cantidad y pureza en el *Western blot* y en la electroforesis teñida con azul de Coomasie (**Figura 14, panel C y panel D**). Sin embargo, nos pareció más adecuada la proteína His-*TcRBP-like*, ya que en el *Western blot* la elusión 6 muestra muy buena cantidad de proteína pura, y al cuantificarla, ésta fue suficiente para los ensayos siguientes. Además, la bandera de His es de tamaño más pequeño a la de GST, lo que representa una ventaja ya que existe menor probabilidad de que interfiera negativamente en las posibles funciones de interacción de *TcRBP-like*.

Procedimos entonces a realizar el ensayo de ARN *pull-down*, interaccionando a la proteína recombinante His-*TcRBP-like* purificada y unida nuevamente a las perlas de sefarosa-Ni (Níquel), con el ARN total de epimastigotes NM1-cl1 expuestos al estímulo de infección.

Para ello primero se obtuvo ARN total de epimastigotes, el cual fue tratado con ADNasa para asegurarnos que después de la reacción de retrotranscripción y amplificación por PCR, el producto no proviniera de ADN contaminante. Ya que era necesario comprobar la integridad del ARN total, corrimos la muestra en un gel desnaturizante, como se describe en Materiales y Métodos. El resultado mostró las bandas esperadas del ARN 28S α , 28S β , y 18S (ARNr), lo que indicó que nuestra muestra de ARN estaba íntegra, que el tratamiento con ADNasa no degradó a la muestra de ARN y que el ARN total estaba listo para ser usado en los ensayos de ARN *pull-down* siguientes (**Figura 15**).

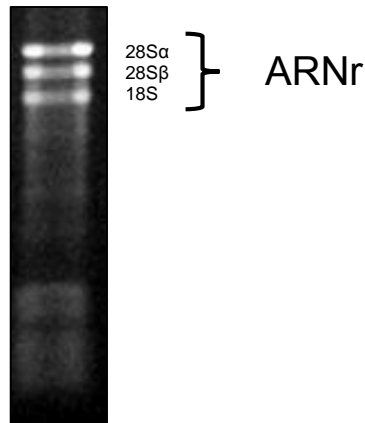


Figura 15. ARN total de epimastigotes NM1-cl1 de *T. cruzi*, con un estímulo de infección. El estímulo de infección se realizó poniendo en contacto a los epimastigotes con fibroblastos LLC-MK2 por 48 horas. El ARN se extrajo con el método de TRIzol y se observa íntegro.

En la **Figura 16** se muestra el resultado obtenido en el ensayo de ARN *pull-down*, en donde la proteína recombinante His-*TcRBP-like* se unió a ARNm(s) de diversos tamaños, como se evidenció al analizar sus productos de amplificación (ADNdc) obtenidos por RT-PCR (**Figura 16, carril 3**). Dichos productos, vistos en forma de barrido en un gel de agarosa, mostraron un rango de tamaño de 400 pb a 5,000 pb y una especificidad de unión por la proteína recombinante, ya que en las perlas control de sefarosa-Ni sin proteína recombinante unida, no se observó ningún producto de amplificación después del RT-PCR, lo que indica que no hubo unión de ARNm de modo inespecífico a las perlas (**Figura 16, carril 4 y 5**). En el caso del ADNcs no se ve el mismo barrido observado en el ADNdc amplificado, pero sí se observan dos bandas tenues de aproximadamente 1,650-2,000 pb (**Figura 16, carril 2**). Estas bandas podrían corresponder a ARNr que se unió a His-*TcRBP-like*, lo que sería factible considerando que las RBP se unen a todo tipo de ARN (Kolev et al., 2014). Sin embargo de ser este el caso, estos ARNr no se amplifican en el paso posterior de obtención del ADNdc debido a que la amplificación por PCR se llevó a cabo con iniciadores de secuencias oligo dT y oligo del miniexón, que amplifican únicamente ARNm(s).

Estos resultados muestran que la proteína recombinante His-*TcRBP-like* une ARNs del parásito y por lo tanto sugiere que *TcRBP-like* es una proteína de unión al ARN. A fin de comprobar esta posibilidad procedimos a clonar, secuenciar y analizar las secuencias de los productos de amplificación anteriores.

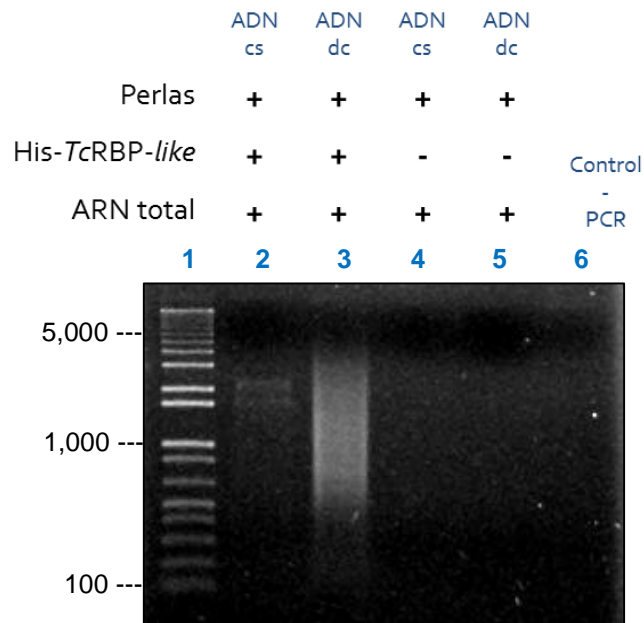


Figura 16. ARN pull-down con His-*TcRBP-like* y ARN total de epimastigotes NM1-cl1 de *T. cruzi*. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. Carril 2: ADNcs, con His-*TcRBP-like*. Carril 3: ADNdc con His-*TcRBP-like*. Carril 4: ADNcs, sin His-*TcRBP-like*. Carril 5: ADNdc sin His-*TcRBP-like*. Carril 6: Control negativo de la PCR. ADNcs: ADN de cadena sencilla. ADNdc: ADN de doble cadena.

8.3. Identificación por secuenciación de ARNm unido a *TcRBP-like*

Los ADNdc amplificados se clonaron en el vector de clonación pGEM-T Easy, como se describe en Materiales y Métodos. Ya que se obtuvieron las colonias bacterianas con (blancas) y sin inserto (azules), se seleccionaron 9 colonias positivas y 1 colonia negativa, a las cuales se les extrajo su ADN de plásmido para analizarlo en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (**Figura 17**).

Los ADNs extraídos de las colonias positivas tienen un mayor tamaño molecular (**Figura 17, carril 2-7 y 9**), que el ADN de la colonia negativa (**Figura 17, carril 10**), lo que sugiere que esos plásmidos podrían contener una secuencia clonada. Hay dos colonias consideradas positivas (**Figura 17, carril 1 y 8**) que muestran el mismo tamaño molecular que la colonia negativa, por lo tanto, podrían no contener un inserto.

Para comprobar esto, los ADNs fueron digeridos con EcoRI, una endonucleasa que corta al vector pGEM-T Easy en las secuencias flanqueantes al sitio de clonación, obteniéndose la liberación de insertos de diferentes tamaños moleculares en un rango de 300 a 1500 pb (**Figura 18, carril 2-7 y 9**), lo que comprueba que efectivamente se clonaron fragmentos de ADNcdc correspondientes a los ARNm(s) que se unieron a His-*TcRBP-like* en el ensayo de ARN *pull-down*. También se comprueba en la **Figura 18, carril 1 y 8**, que estas dos colonias antes consideradas positivas, no lo son, porque luego de la digestión no hay liberación de un fragmento.

En algunos casos (**Figura 17, carril 2, 5-7 y 9**) se observó la presencia de más de una banda de clonación indicativo de que el fragmento clonado contiene sitio(s) de corte para EcoRI, sugiriendo por tanto que el tamaño de los fragmentos clonados en algunos casos es mayor a 1500 pb. Además, el hecho de haber obtenido fragmentos de diferentes tamaños indica que la calidad de la biblioteca es buena ya que se tienen secuencias de diferentes ADNdc correspondientes a distintos ARNm(s).

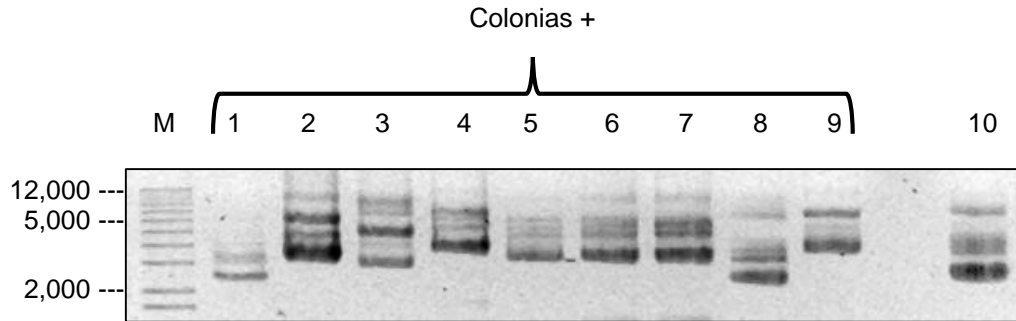


Figura 17. ADNs de colonias obtenidas en la clonación del ADNdc, en el vector pGEM-T Easy. Las colonias 1-9 son positivas, mientras que la colonia 10 es negativa. M: Marcador de tamaño molecular.

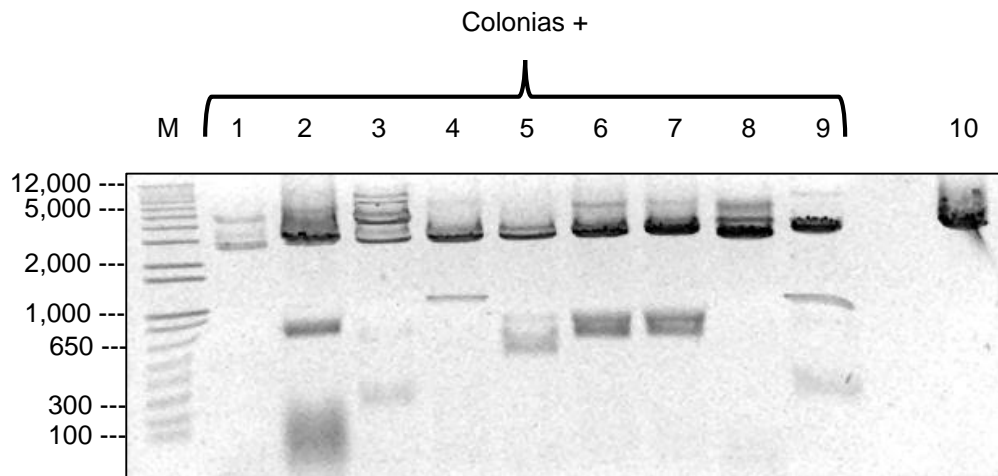


Figura 18. Digestión de ADNs de colonias obtenidas en la clonación del ADNdc. La digestión se llevó a cabo con la enzima de restricción EcoRI, que corta al vector pGEM-T Easy en dos sitios, flanqueando al inserto. Se observan fragmentos liberados en la digestión de alrededor de 1,000 pb. M: Marcador de tamaño molecular.

Luego de llevar a cabo la digestión de los ADNs y comprobar que las colonias tienen insertos de diversos tamaños, correspondientes a ARNm(s) unidos en el ensayo de ARN *pull-down*, procedimos a secuenciar algunos de estos ADNs para conocer que transcrito tienen clonado en su secuencia. Por cuestiones de tiempo, en este momento sólo se analizó una muestra representativa de tres colonias positivas (las colonias 2, 4 y 5) que parecen tener insertos diferentes, ya que en la **Figura 18, carril 2, 4 y 5** muestran que

luego de la digestión realizada con EcoRI, liberan fragmentos de tamaños moleculares diferentes. Y en experimentos futuros como continuación de este trabajo se analizarán el total de las colonias obtenidas en la biblioteca.

En la **Tabla 6** se observan los resultados obtenidos de la secuenciación. Las secuencias fueron analizadas con el programa *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-NCBI-NIH* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificar los transcritos a los que corresponden y se buscaron dominios conservados en las proteínas que estas secuencias codifican, con el programa *ScanProsite* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>). Estos resultados muestran que His-*TcRBP-like* se unió a los transcritos de la histona H1, de la proteína ribosomal S7 y de la proteína ribosomal L37.

Colonia a la que pertenece el ADN secuenciado	Proteína que codifica	No. de nucleótidos de la proteína codificada	No. de nucleótidos secuenciados	% de cobertura	% de identidad	Dominio conservado
2	Histona H1	537	1031	42%	68%	NL
4	Proteína ribosomal S7	636	1063	57%	90%	NL
5	Proteína ribosomal L37	255	951	26%	98%	Dos dedos de zinc

*NL: No localizado.

Tabla 6. ARNm(s) unidos a *TcRBP-like* en ensayos de ARN *pull-down*.

Muestra representativa con tres ARNs unidos a la proteína en estudio, obtenidos por secuenciación.

Todos estos resultados en conjunto indican que *TcRBP-like* tiene la capacidad de interactuar con ARNm de la cepa NM1-cl1 de *T. cruzi*, en ensayos *in vitro*. Esto no descarta que se una a otros ARNs, sin embargo, en este ensayo no se ha demostrado la unión a ellos. A su vez, se requiere realizar ensayos futuros *in vivo*, para determinar si esta interacción también sucede dentro del parásito de modo natural y si esta unión se modifica ante diferentes estímulos como infección o diferenciación, entre otros.

IX. DISCUSIÓN

T. cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito intracelular obligado capaz de infectar todo tipo de células nucleadas. El proceso de infección de *T. cruzi* se describió desde hace varios años y se sabe que es un evento complejo en el que se ha sugerido participan diversas moléculas, tanto del parásito como de la célula blanco. A pesar de que el ciclo intracelular en el hospedero mamífero es un paso determinante para el establecimiento de la enfermedad, la sobrevivencia del parásito y completar su ciclo de vida, muy poco se sabe de las moléculas que participan y de los mecanismos moleculares involucrados.

En un trabajo previo se realizaron análisis de secuenciación masiva de transcritos y proteínas, de dos cepas de *T. cruzi* con diferente grado de infectividad y se realizaron análisis de expresión diferencial, en donde se identificó a la secuencia TCSYLVIO_006186 anotada como una RBP putativa, la cual se expresa diferencialmente a nivel de transcrito y proteína en la cepa alta infectiva (NM1-cl1) con respecto a la cepa baja infectiva (CI2-cl2), y a la que denominamos en este trabajo de investigación como *TcRBP-like*.

No se conoce el número exacto de RBPs que existen en *T. cruzi*, pero se calcula que hay alrededor de 200, conteniendo diferentes motivos de unión al ARN. Ochenta y una de esas proteínas cuentan con un motivo RRM (Perez-Diaz et al., 2017) al igual que *TcRBP-like*. Este dato resulta interesante al considerar que a pesar de que el parásito cuenta con tantas RBPs, en el trabajo previo se encontró solamente a una posible RBP (*TcRBP-like*) con expresión diferencial asociada a la cepa NM1-cl1. Esto toma aún más relevancia ya que se sabe que las RBPs pueden actuar como moduladores de la abundancia de los ARNm(s) y de su eficiencia de traducción, encontrándose además en *T. brucei* RBPs que pueden regular el nivel de un grupo de transcritos relacionados funcionalmente con el proceso de infección del parásito (Kolev et al., 2012).

El análisis *in silico* realizado a la secuencia TCSYLVIO_006186 de la cepa Sylvio X-10 de *T. cruzi*, que es la secuencia que podría tener mayor identidad con *TcRBP-like* de la cepa NM1-cl1, sugiere que hay alta probabilidad de que *TcRBP-like* sea efectivamente una RBP, lo que se validó experimentalmente en este trabajo de investigación.

Al hacer la búsqueda de ortólogos de *TcRBP-like* en tripanosomátidos, pudimos encontrar a varias secuencias con alta similitud en donde todas corresponden a RBPs putativas, ya que aún no han sido caracterizadas. Sin embargo, para todas ellas se ha identificado un motivo RRM dentro de su secuencia, por lo que se han clasificado como probables RBPs.

Por otro lado, la secuencia TCSYLVIO_006186 es similar también a otras secuencias de proteínas humanas y de *D. melanogaster*. De modo muy particular, hay similitud entre la secuencia de interés y las proteínas humanas Bruno-like y de la familia Elav-like, entre otras. Originalmente, la proteína Bruno es una RBP con un motivo RRM que se descubrió en *D. melanogaster* y se expresa principalmente en los oocitos. Su función es la de un represor traduccional de un ARNm llamado *oskar*. En esta especie, *oskar* se requiere para la formación de células germinales y posteriormente para el posicionamiento del embrión, es decir, en la embriogénesis temprana. Tanto el ARNm *oskar* como la proteína a la que éste da lugar (proteína Oskar) se localizan en el polo posterior del oocito para su desarrollo correcto. La proteína Bruno reprime la expresión del ARNm *oskar*, mediante su unión a secuencias del UTR 3' de *oskar*, sitios que son llamados elementos de respuesta a Bruno o BREs (por sus siglas en inglés, *Bruno Response Elements*). La eliminación de los sitios BREs resulta en una mala traducción de la proteína Oskar en el extremo anterior del oocito, dando lugar a embriones con dos polos posteriores. Esta proteína también se ha identificado en otros organismos, por ejemplo en humanos, los cuales presentan 6 proteínas Bruno-like, que se unen a las mismas secuencias de ARNm que la proteína Bruno en *D. melanogaster*, demostrando que las secuencias de estas proteínas son conservadas entre

especies, así como su especificidad de unión por su ARN blanco (Good et al., 2000).

Las proteínas Bruno son similares en la estructura de sus dominios a otra familia de proteínas llamada Elav. Las proteínas de la familia Elav se descubrieron también en *D. melanogaster*. Estas son RBPs que regulan varios procesos celulares por medio de su unión al ARNm (Good et al., 2000). Una de esas funciones (también observada en algunas proteínas Bruno-like) es regular el *splicing* alternativo de un pre-ARNm que codifica para la α -actinina, que junto con las cateninas y cadherinas interviene en la adhesión celular (Suzuki et al., 2002). Las proteínas Elav, además juegan un papel en la regulación de la diferenciación, ya que se ha visto que su sobreexpresión mejora dicho proceso celular (Good et al., 2000).

Otro ejemplo de una RBP con la cual *TcRBP-like* presenta similitud es la proteína humana Bruno-like 2 (BRUNOL2), que es una RBP que se une a repetidos CUG en algunos ARNm y fue nombrada también como proteína de unión a CUG o CUGBP1 (por sus siglas en inglés, *CUG-Binding Protein 1*). BRUNOL2 en humanos está implicada en la etiología de la distrofia miotónica ya que se une a los repetidos CUG del ARNm que codifica para la proteína cinasa de la distrofia miotónica o DMPK (por sus siglas en inglés, *Dystrophia Myotonica Protein Kinase*). BRUNOL2 (CUGBP1) también regula el *splicing* alternativo del pre-ARNm de la troponina T cardiaca al interactuar con el *enhancer* del *splicing* que contiene repetidos CUG (Good et al., 2000). Por otro lado, se sugiere que las proteínas CUGBP también regulan el *splicing* alternativo del pre-ARNm de la proteína precursora de amiloide (APP, por sus siglas en inglés, *Amyloid Precursor Protein*) (Poleev et al., 2000). Debido a esto, se propone que los miembros de esta familia de genes podrían estar involucrados en algunas enfermedades humanas (Good et al., 2000).

Son muchas las funciones que pueden tener las RBPs. Dada la similitud de la secuencia TCSYLVIO_006186 con las secuencias de las proteínas Bruno-like y las proteínas de la familia Elav, se sugiere que *TcRBP-like* podría tener una función similar en *T. cruzi*, regulando el *trans-splicing* y/o el *trans-*

splicing alternativo de algunos pre-ARNm. Esto sugeriría un papel importante de *TcRBP-like* considerando que la regulación de la expresión del parásito es post-transcripcional a nivel de eficiencia del *trans-splicing* y poliadenilación. Además, su posible relación con el proceso de adhesión y/o de diferenciación en la célula podría también ser similar en el parásito. Ya que el proceso de infección inicia con la adhesión del parásito a la célula blanco y la posterior diferenciación del mismo (de tripomastigote a amastigote y de éste último a tripomastigote sanguíneo) antes de salir de la célula infectada. Lo que no podemos determinar hasta este momento, es si la función de *TcRBP-like* podría ser positiva o negativa sobre sus blancos.

Para corroborar los datos obtenidos del análisis bioinformático, que sugieren que *TcRBP-like* es una RBP, se llevó a cabo el ensayo de ARN *pull-down*. En él, se comprobó la unión de ARNm(s) de epimastigotes NM1-cl1 a la proteína recombinante *TcRBP-like* en ensayos *in vitro*. *TcRBP-like* se unió a diversos ARNm(s), de los cuales hemos identificado hasta el momento a tres de ellos, correspondientes a histona H1 y a las proteínas ribosomales putativas S7 y L37.

En *T. cruzi* hay una familia de genes que codifican un grupo de histonas H1 de entre 74 y 97 aminoácidos (Aslund et al., 1994). Estas proteínas han sido previamente caracterizadas en el parásito y fungen como pieza de cierre en cada nucleosoma, conformado por las otras histonas rodeadas por el ADN genómico del parásito. A diferencia de las histonas H1 en otros eucariontes, en *T. cruzi* estas proteínas carecen del dominio globular que las caracteriza, y son en general, proteínas más pequeñas que en los demás organismos (da Cunha et al., 2005).

En eucariontes superiores, las histonas sufren varias modificaciones post-traduccionales, que son importantes para el control de la transcripción, la replicación, la reparación del daño del ADN y la condensación cromosómica. En *T. cruzi*, las histonas son menos conservadas y parecen contener sitios alternativos para las modificaciones, que podrían revelar funciones únicas y evolutivas. Por ejemplo la fosforilación de la histona H1, que sucede en un solo

sitio de cinasa dependiente de ciclina (en la serina 12 de la secuencia SPKK) y que está íntimamente relacionada con la progresión del ciclo celular, ya que se ha observado que cuando las células pasan por la fase G2, la histona H1 se fosforila llegando a su fosforilación máxima al inicio de la mitosis (fase M). Esto da como resultado, que la fosforilación sea mayor en el estadio replicativo de epimastigote, a diferencia del estadio no replicativo de tripomastigote, sugiriendo que la fosforilación de la histona H1 de *T. cruzi* promueve la replicación del parásito (de Jesus et al., 2016; da Cunha et al., 2005; Gutiyama et al., 2008).

Por otro lado, las proteínas ribosomales S7 y L37 de *T. cruzi* han sido identificadas en la cepa CL Brener, luego de la secuenciación del genoma del parásito, publicado en el año 2005. Sin embargo, son secuencias putativas aún, no bien caracterizadas y se les atribuyen sus nombres porque poseen identidad con las proteínas ribosomales S7 y L37 de otros organismos. En humanos, la proteína S7 es parte de la unidad ribosomal 40S, mientras que la proteína L37 es parte de la unidad ribosomal grande, 60S. La proteína S7 de *T. cruzi*, con 202 aminoácidos, no cuenta con dominios conservados en su secuencia. Por su parte, la proteína L37, de 84 aminoácidos, presenta el dominio central de las proteínas ribosómicas L37ae y L37e, que comparten un dominio común de unión a metales de tipo rubredoxina (proteínas de bajo peso molecular que contienen hierro y generalmente metabolizan azufre, relacionándose con las especies reactivas de oxígeno desintoxicantes). Este dominio localizado del aminoácido cuatro al 23, cuenta con dos dedos de zinc, por lo que podría interaccionar con otros ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN, aunque eso no está comprobado para esta proteína de *T. cruzi* en particular.

Cabe destacar, que al parecer *TcRBP-like* se podría unir al UTR 3' de los transcritos, ya que en el análisis *in silico* de la secuencia de ambas proteínas ribosomales S7 y L37 del parásito se detectó parte de esta región en sus transcritos, tal como sucede con la mayoría de las RBPs, que como se

mencionó anteriormente interaccionan principalmente con la región 3' de sus blancos.

Como se ha mencionado antes, las RBPs podrían ejercer en el parásito una regulación positiva o negativa sobre los niveles de los transcritos a los que se une. Con los resultados que tenemos hasta el momento no podemos saber aún si los transcritos blanco de la histona H1, y de las proteínas ribosomales S7 y L37 están siendo regulados positiva o negativamente y el impacto que esto podría tener en el fenotipo del parásito.

Hasta el momento sólo hemos secuenciado tres clonas por cuestiones de tiempo limitado en el desarrollo del trabajo de maestría, pero planeamos llevar a cabo experimentos de secuenciación masiva del total de las clonas de tres experimentos independientes para poder estimar si *TcRBP-like* está regulando grupos de mensajeros que estén relacionados funcionalmente, y determinar si lo hace de manera positiva o negativa.

Además de realizar estos análisis *in vitro*, también se planea realizar a futuro un análisis *in vivo* para corroborar el resultado obtenido *in vitro* y determinar si la interacción de *TcRBP-like* con el ARNm se lleva a cabo también dentro del parásito.

La caracterización molecular de *TcRBP-like* puede contribuir no sólo en el entendimiento del proceso de infección de *T. cruzi*, sino también en la dilucidación de los mecanismos que este parásito lleva a cabo para regular la expresión de sus genes. Además, la posibilidad de identificar y caracterizar moléculas que puedan tener un papel determinante en el proceso de infección intracelular del parásito, del cual depende el desarrollo de la fisiopatología de la enfermedad de Chagas, permitiría contar con posibles blancos terapéuticos y/o vacúnales para el futuro control de esta enfermedad.

X. CONCLUSIONES

TcRBP-like recombinante se une a ARNm(s) de la cepa NM1-cl1 de *T. cruzi*, en ensayos *in vitro*.

XI. PERSPECTIVAS

1. Comprobar la posible unión *in vivo* de *TcRBP-like*, al ARN de parásitos transfectados que expresen *TcRBP-like*-HA y expuestos al proceso de infección, usando el ensayo de RIP-seq.
2. Clonar e identificar por secuenciación, el ARNm unido a *TcRBP-like*-HA de *T. cruzi*, obtenido en los ensayos de RIP-seq.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Alves, L.R., and Goldenberg, S.** (2016). RNA-binding proteins related to stress response and differentiation in protozoa. *World journal of biological chemistry* 7, 78-87.
- **Aslund, L., Carlsson, L., Henriksson, J., Rydaker, M., Toro, G.C., Galanti, N., and Pettersson, U.** (1994). A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 65, 317-330.
- **Atwood, J.A., 3rd, Weatherly, D.B., Minning, T.A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F.R., Orlando, R., and Tarleton, R.L.** (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309, 473-476.
- **Bates, E.J., Knuepfer, E., and Smith, D.F.** (2000). Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic acids research* 28, 1211-1220.
- **Batista, J.A., Teixeira, S.M., Donelson, J.E., Kirchhoff, L.V., and de Sa, C.M.** (1994). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. *Molecular and biochemical parasitology* 67, 301-312.
- **Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., et al.** (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-422.
- **Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M.J., and Montgomery, S.P.** (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical microbiology reviews* 24, 655-681.
- **Camargos, E.R., Franco, D.J., Garcia, C.M., Dutra, A.P., Teixeira, A.L., Jr., Chiari, E., Concei, and Machado, C.R.** (2000). Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 62, 604-612.
- **Canepa, G.** (2010). Genómica funcional de transportadores de aminoácidos y poliaminas de *Trypanosoma cruzi* (Tesis Doctoral). Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina.
- **Carabarin-Lima, A., Gonzalez-Vazquez, M.C., Rodriguez-Morales, O., Baylon-Pacheco, L., Rosales-Encina, J.L., Reyes-Lopez, P.A., and Arce-Fonseca, M.** (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update. *Acta tropica* 127, 126-135.
- **Caro, F., Bercovich, N., Atorrasagasti, C., Levin, M.J., and Vazquez, M.P.** (2006). *Trypanosoma cruzi*: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. *Experimental parasitology* 113, 112-124.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Parasites-American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Actualizado en marzo de 2015.
- **Chagas, C.** (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1, 159-218.
- **Clayton, C.** (2013). The regulation of *trypanosome* gene expression by RNA-binding proteins. *PLoS pathogens* 9, e1003680.
- **Clayton, C.E.** (2014). Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 195, 96-106.

- **Clery, A., Blatter, M., and Allain, F.H.** (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Current opinion in structural biology* 18, 290-298.
- **Coalición Chagas.** (2016). Info Chagas. Instituto de Salud Global de Barcelona. Disponible en: <http://www.infochagas.org/>. Consultado el 30 de mayo de 2016.
- **Coura, J.R., and Vinas, P.A.** (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465, S6-7.
- **D'Orso, I., and Frasch, A.C.** (2001). TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes. *The Journal of biological chemistry* 276, 34801-34809.
- **D'Orso, I., and Frasch, A.C.** (2002). TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and Poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. *The Journal of biological chemistry* 277, 50520-50528.
- **D'Orso, I., De Gaudenzi, J.G., and Frasch, A.C.** (2003). RNA-binding proteins and mRNA turnover in *trypanosomes*. *Trends in parasitology* 19, 151-155.
- **da Cunha, J.P., Nakayasu, E.S., Elias, M.C., Pimenta, D.C., Tellez-Inon, M.T., Rojas, F., Munoz, M.J., Almeida, I.C., and Schenkman, S.** (2005). Trypanosoma cruzi histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle. *Molecular and biochemical parasitology* 140, 75-86.
- **Das, A., Peterson, G.C., Kanner, S.B., Frevert, U., and Parsons, M.** (1996). A major tyrosine-phosphorylated protein of *Trypanosoma brucei* is a nucleolar RNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 271, 15675-15681.
- **De Gaudenzi, J., Frasch, A.C., and Clayton, C.** (2005). RNA-binding domain proteins in Kinetoplastids: a comparative analysis. *Eukaryotic cell* 4, 2106-2114.
- **de Jesus, T.C., Nunes, V.S., Lopes Mde, C., Martil, D.E., Iwai, L.K., Moretti, N.S., Machado, F.C., de Lima-Stein, M.L., Thiemann, O.H., Elias, M.C., et al.** (2016). Chromatin Proteomics Reveals Variable Histone Modifications during the Life Cycle of Trypanosoma cruzi. *Journal of proteome research* 15, 2039-2051.
- **de Souza, W., de Carvalho, T.M., and Barrias, E.S.** (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International journal of cell biology* 2010.
- **El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., et al.** (2005a). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409-415.
- **El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E.A., Hertz-Fowler, C., et al.** (2005b). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309, 404-409.

- **Espinoza, B., and Manning-Cela R.** (2007). An overview of mammalian cell infection by *Trypanosoma cruzi*: Cellular and molecular basis. *Advances in the immunobiology of parasitic diseases*, 291-311.
- **Estevez, A.M., Kempf, T., and Clayton, C.** (2001). The exosome of *Trypanosoma brucei*. *The EMBO journal* 20, 3831-3839.
- **Good, P.J., Chen, Q., Warner, S.J., and Herring, D.C.** (2000). A family of human RNA-binding proteins related to the *Drosophila* Bruno translational regulator. *The Journal of biological chemistry* 275, 28583-28592.
- **Greif, G., Ponce de Leon, M., Lamolle, G., Rodriguez, M., Pineyro, D., Tavares-Marques, L.M., Reyna-Bello, A., Robello, C., and Alvarez-Valin, F.** (2013). Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. *BMC genomics* 14, 149.
- **Guerra-Slompo, E.P., Probst, C.M., Pavoni, D.P., Goldenberg, S., Krieger, M.A., and Dallagiovanna, B.** (2012). Molecular characterization of the *Trypanosoma cruzi* specific RNA binding protein TcRBP40 and its associated mRNAs. *Biochemical and biophysical research communications* 420, 302-307.
- **Guhl, F.** (2009). Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Rev Biomed* 20, 228-234.
- **Gutiyama, L.M., da Cunha, J.P., and Schenkman, S.** (2008). Histone H1 of *Trypanosoma cruzi* is concentrated in the nucleolus region and disperses upon phosphorylation during progression to mitosis. *Eukaryotic cell* 7, 560-568.
- **Hendriks, E.F., Robinson, D.R., Hinkins, M., and Matthews, K.R.** (2001). A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. *The EMBO journal* 20, 6700-6711.
- **Hoek, M., Zanders, T., and Cross, G.A.** (2002). *Trypanosoma brucei* expression-site-associated-gene-8 protein interacts with a Pumilio family protein. *Molecular and biochemical parasitology* 120, 269-283.
- **Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., et al.** (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.
- **Kolev, N.G., Franklin, J.B., Carmi, S., Shi, H., Michaeli, S., and Tschudi, C.** (2010). The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. *PLoS pathogens* 6, e1001090.
- **Kolev, N.G., Ramey-Butler, K., Cross, G.A., Ullu, E., and Tschudi, C.** (2012). Developmental progression to infectivity in *Trypanosoma brucei* triggered by an RNA-binding protein. *Science* 338, 1352-1353.

- **Kolev, N.G., Ullu, E., and Tschudi, C.** (2014). The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Cellular microbiology* 16, 482-489.
- **Kramer, K., Sachsenberg, T., Beckmann, B.M., Qamar, S., Boon, K.L., Hentze, M.W., Kohlbacher, O., and Urlaub, H.** (2014). Photo-cross-linking and high-resolution mass spectrometry for assignment of RNA-binding sites in RNA-binding proteins. *Nature methods* 11, 1064-1070.
- **Kuwasako, K., Takahashi, M., Unzai, S., Tsuda, K., Yoshikawa, S., He, F., Kobayashi, N., Guntert, P., Shirouzu, M., Ito, T., et al.** (2014). RBFOX and SUP-12 sandwich a G base to cooperatively regulate tissue-specific splicing. *Nature structural & molecular biology* 21, 778-786.
- **LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., and Beverley, S.M.** (1993). Coupling of poly(A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. *Genes & development* 7, 996-1007.
- **Liang, X.H., Haritan, A., Uliel, S., and Michaeli, S.** (2003). *trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic cell* 2, 830-840.
- **Lima, L., Espinosa-Alvarez, O., Ortiz, P.A., Trejo-Varon, J.A., Carranza, J.C., Pinto, C.M., Serrano, M.G., Buck, G.A., Camargo, E.P., and Teixeira, M.M.** (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta tropica* 151, 166-177.
- **Lorkovic, Z.J., and Barta, A.** (2002). Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research* 30, 623-635.
- **Magalhães, L.M.D., Viana, A., Chiari, E., Galvão, L.M.C., Gollob, K.J., and Dutra, W.O.** (2015). Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9, e0003816.
- **Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martinez, L.E., Manning-Cela, R.G., and Figueroa-Angulo, E.E.** (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 525241.
- **Martínez-Cuevas, T.I.** (2013). Caracterización biológica y molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en el Estado de Oaxaca (Tesis de Maestría). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Biomedicina Molecular. Ciudad de México, México.
- **Matthews, K.R., Tschudi, C., and Ullu, E.** (1994). A common pyrimidine-rich motif governs *trans*-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes & development* 8, 491-501.
- **Montgomery, S.P., Starr, M.C., Cantey, P.T., Edwards, M.S., and Meymandi, S.K.** (2014). Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 90, 814-818.

- **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Enfermedades tropicales desatendidas: preguntas más frecuentes. Actualizado en diciembre de 2010.
- **Organización Mundial de la Salud (OMS).** La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Actualizado en marzo de 2016.
- **Organización Panamericana de la Salud (OPS).** Enfermedad de Chagas. Actualizado en abril de 2014.
- **Ouellette, M., and Papadopoulou, B.** (2009). Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. *Journal of biology* 8, 100.
- **Perez-Diaz, L., Silva, T.C., and Teixeira, S.M.** (2017). Involvement of an RNA binding protein containing Alba domain in the stage-specific regulation of beta-amastin expression in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 211, 1-8.
- **Poleev, A., Hartmann, A., and Stamm, S.** (2000). A trans-acting factor, isolated by the three-hybrid system, that influences alternative splicing of the amyloid precursor protein minigene. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 4002-4010.
- **Ramos-Ligonio, A., Torres-Montero, J., Lopez-Monteon, A., and Dumonteil, E.** (2012). Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12, 1341-1343.
- **Rassi, A., Jr., Rassi, A., and Marin-Neto, J.A.** (2010). Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-1402.
- **Reis-Cunha, J.L., Rodrigues-Luiz, G.F., Valdivia, H.O., Baptista, R.P., Mendes, T.A., de Morais, G.L., Guedes, R., Macedo, A.M., Bern, C., Gilman, R.H., et al.** (2015). Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *BMC genomics* 16, 499.
- **Riou, G.F., and Yot, P.** (1977). Heterogeneity of the kinetoplast DNA molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry* 16, 2390-2396.
- **Rodrigues, C.M., Valadares, H.M., Francisco, A.F., Arantes, J.M., Campos, C.F., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Araujo, M.S., Arantes, R.M., Chiari, E., et al.** (2010). Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e846.
- **Sambrook, J., and Rusell, D.** (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- **Souza, R.T., Lima, F.M., Barros, R.M., Cortez, D.R., Santos, M.F., Cordero, E.M., Ruiz, J.C., Goldenberg, S., Teixeira, M.M., and da Silveira, J.F.** (2011). Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PloS one* 6, e23042.

- **Subota, I., Rotureau, B., Blisnick, T., Ngwabyt, S., Durand-Dubief, M., Engstler, M., and Bastin, P.** (2011). ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. *Molecular biology of the cell* 22, 4205-4219.
- **Suzuki, H., Jin, Y., Otani, H., Yasuda, K., and Inoue, K.** (2002). Regulation of alternative splicing of alpha-actinin transcript by Bruno-like proteins. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 7, 133-141.
- **Tarleton, R.L., Gurtler, R.E., Urbina, J.A., Ramsey, J., and Viotti, R.** (2014). Chagas disease and the london declaration on neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3219.
- **Teixeira, A.R., Hecht, M.M., Guimaro, M.C., Sousa, A.O., and Nitz, N.** (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology reviews* 24, 592-630.
- **Teixeira, A.R., Nitz, N., Guimaro, M.C., Gomes, C., and Santos-Buch, C.A.** (2006). Chagas disease. *Postgraduate medical journal* 82, 788-798.
- **Teixeira, S.M., de Paiva, R.M., Kangussu-Marcolino, M.M., and Darocha, W.D.** (2012). Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genetics and molecular biology* 35, 1-17.
- **Vargas, N., Pedroso, A., and Zingales, B.** (2004). Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Molecular and biochemical parasitology* 138, 131-141.
- **Zago, M.P., Hosakote, Y.M., Koo, S.J., Dhiman, M., Pineyro, M.D., Parodi-Talice, A., Basombrio, M.A., Robello, C., and Garg, N.J.** (2016). TcI Isolates of *Trypanosoma cruzi* Exploit the Antioxidant Network for Enhanced Intracellular Survival in Macrophages and Virulence in Mice. *Infection and immunity* 84, 1842-1856.
- **Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., et al.** (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12, 240-253.
- **Zingales, B., Pereira, M.E., Oliveira, R.P., Almeida, K.A., Umezawa, E.S., Souto, R.P., Vargas, N., Cano, M.I., da Silveira, J.F., Nehme, N.S., et al.** (1997). *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta tropica* 68, 159-173.