

61  
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

ORGANIZACION GENICA Y EXPRESION DEL GEN  
QUE CODIFICA PARA LA PROTEINA RIBOSOMAL  
S4 DE *TRYPANOSOMA CRUZI*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

JULIANA HERRERA LOPEZ



MEXICO, D. F.

262507

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Prof. VELASCO CASTREJÓN OSCAR.

**VOCAL:** Prof. AGUILAR CABALLERO RAÚL.

**SECRETARIO:** Prof. HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ ROBERTO.

**1er Suplente:** Prof. GUTIERREZ RAMOS ABEL.

**2do. Suplente** Prof. RODRIGUEZ PENAGOS MIREYA.

El trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular del  
**Instituto de Investigación Biomédica.**

**Asesor del tema:**



Dr. Roberto Hernández Fernández.

**Sustentante:**



Juliana Herrera López.

## DEDICATORIAS.

*Terminar esta tesis representa para mí no solo el trámite de obtener un título profesional, si no el iniciar nuevos retos y aspiraciones profesionales y personales.*

*A mi abuelita Juliana:*

*Le dedico el presente trabajo con profundo amor, admiración y respeto por todo el apoyo y cariño incondicional que me ha dado toda mi vida para lograr mis objetivos.*

*A mi mamá:*

*Por haberme dado lo más bello, la vida y amor incalculable.*

*A mi tía Ofelia:*

*Por comprender todas mis locuras y encaminarme en los primeras preocupaciones estudiantiles.*

*A mis hermanas: Adriana, Diana, Carolina y primos Jorge, Blanca y Cleira.*

*A mi Asesor:*

*Por creer en mí y darme la oportunidad de realizar el presente trabajo, brindándome enseñanza y apoyo.*

*A la Dra. Imelda que junto con Lorena, Norma y Mariana me brindaron además de su amistad, agradables momentos de trabajo.*

*A Santiago por su contribución técnico en el trabajo experimental.*

*A la Familia Barragan por brindarme su amistad y confianza; y especialmente a mi amiga Rocío por su contribución en la parte computacional, que junto con mi amiga Pati termine de editar este trabajo.*

*A mis amigos:*

*Mari Paz, Alejandra y familia, Jorge, Jose Luis, y a todo el grupo del lab. 114.*

*A mis amigos de etapas pasadas que siguen estando presentes y cuya amistad agradezco: Carmen, Sonia, Angélica y Luis. Me considero afortunada en tener tantos amigos, razón por la cual muy seguramente olvidé mencionar a más de uno. Les pido disculpas.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a la UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MÉXICO el haberme brindado la oportunidad de estudiar una carrera profesional en sus instalaciones; así como a la Facultad de Química y todos los profesores que contribuyeron en mi preparación.*

*Al Dr. Roberto Hernández, gracias por sus enseñanzas y consejos que en todo momento se basan en el principio de la calidad.*

*A mi Jurado asignado por la lectura y revisión del presente trabajo.*

## Resumen.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es producida por *T.cruzi*. Este parásito se caracteriza por su variabilidad biológica y genética, y posiblemente ambas se relacionan con las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas en humanos. En lo que respecta a la biología molecular del parásito, *T.cruzi* muestra mecanismos atípicos en el manejo y expresión de su genoma, que aunado al interés médico lo hacen un modelo interesante de estudiar. Con el interés de describir la organización genómica y expresión del gene para la proteína ribosomal S4 en *T.cruzi* (cepa CL Brener), se realizaron ensayos tipo Southern Blot (genómico y cromosomal) y Northern Blot. Se utilizó como sonda homóloga el DNAc de la proteína S4. El análisis de Southern Blot del DNA genómico digerido con cuatro enzimas de restricción que no cortan dentro del DNAc (*EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *ClaI*) y *HindIII* que si tiene sitio de corte, sugieren la presencia de dos copias génicas para la proteína S4. Los fragmentos de restricción obtenidos en digestiones dobles se analizaron para proponer dos posibles arreglos genicos en mapas de restricción. Conjuntamente se analizó la localización cromosomal mediante electroforesis de campos alternos transversos (TAFE). Al analizar el perfil de hibridación cromosomal se observa dos bandas cromosomales para la proteína S4 (800 y 900 kbp). Estos resultados apoyan la existencia de dos genes, anteriormente sugerido. Nuestros análisis de expresión con relación a la proliferación celular, indica que el tamaño del transcrito para la proteína S4 es aproximadamente 1.0 kb. Las concentraciones de equilibrio del RNA para esta proteína ribosomal en fase logarítmica y estacionaria son similares. Estos hallazgos no excluyen que bajo diferentes condiciones de crecimiento exista regulación traduccional o posttraduccional de la proteína ribosomal S4. El estudio de esta proteína ribosomal es una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio que podría aportar conocimientos en la estructura e interacción de la proteína S4 con los demás componentes ribosomales en *T.cruzi*.

## Abreviaturas.

$\mu\text{Ci}$	Microcuries.
$\mu\text{g}$	Microgramos.
ng	Nanogramos.
$\mu\text{L}$	Microlitos.
nm	Nanómetros.
mA	Miliamperios.
cpm	Cuentas por minuto.
pb	Pares de bases.
kp	Kilo bases.
kbp	Kilo pares de bases.
D.O.	Densidad óptica.
dATP	Trifosfato de dideoxiadenina
dGTP	Trifosfato de dideoxiguanina.
dTTP	Trifosfato de dideoxitimina.
dCTP	Trifosfato de dideoxicitosina.
DNAc	Ácido desoxirínucleico complementario.
DNAr	Ácido desoxirínucleico ribosomal.
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero.
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribosomal.
DEPC	Dietil pirocarbonato.
EDTA	Etilendinitrotetra acético sódico.
LIT	Medio de infusión de hígado.
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico.
PVP	Polivinil pirrolidona.
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SSC	Solución de sales de sodio y citrato.
TBE	Amortiguador tris-hidroxi metilaminometano-boratos-EDTA.
TE	Amortiguador tris-hidroxi metilaminometano-EDTA
TBS	Amortiguador tris-hidroxi metilaminometano-sodio.
TAFE	Electroforesis de campos alternos transversos.



# *CAPITULO I*

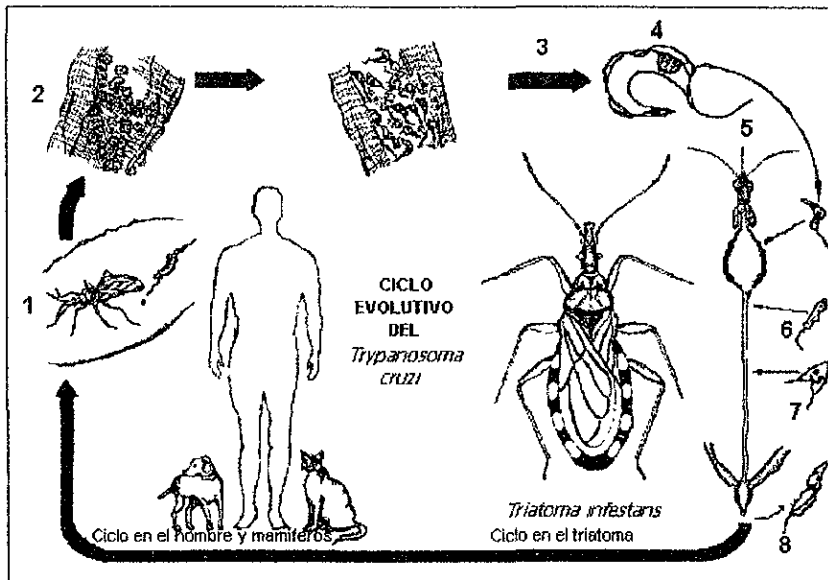
## *INTRODUCCIÓN*

En 1940 Mazzotti informó por primera vez sobre la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana en México (Mazzotti,1940). El agente etiológico de esta enfermedad es un protozooario hemoflagelado, llamado *Trypanosoma cruzi*, que pertenece al orden kinetoplastida, (organismos con un cinetoplasto). Al igual que otros protozoarios parásitos, *T.cruzi* cursa durante su desarrollo por estadios de diferenciación con formas distinguibles e identificables. La identificación de estos estadios se basan en la forma general de la célula, la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo y la región donde el flagelo emerge (Perieda, 1990).

### **1.1 Ciclo Biológico.**

*T.cruzi* presenta tres estadios en su ciclo biológico. tripomastigote, amastigote y epimastigote. Este ciclo involucra vertebrados mamíferos (hospederos y reservorios), y a un vector triatómino hematófago, que en México es comúnmente llamada chinche hocicona.

El ciclo de vida puede iniciarse con la fase de tripomastigote metacíclico presente en la materia fecal del triatómino infectado. Esta forma del parásito puede alcanzar conjuntivas o mucosas de huésped potencial asociado a un periodo de alimentación del vector hematófago. El parásito puede infectar células del huésped y adoptar la forma proliferativa de amastigote. Los amastigotes intracelulares se diferencian en tripomastigotes. Con la lisis de la célula infectada, los tripomastigotes son liberados al torrente sanguíneo. En una ingesta sanguínea del vector hematófago los tripomastigotes sanguíneos sufren cambios estructurales en el tubo digestivo del vector y se transforman en epimastigotes. Dentro de la parte posterior del intestino, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos infectantes los cuales son expulsados con las heces del vector, y con ello pueden continuar su ciclo de vida (fig. 1). Además de la infección vía huésped-invertebrado, la tripanosomiasis puede transmitirse por hemotransfusión, vía transplacentaria, y contaminación accidental en el laboratorio.



**Figura 1:** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.. Tripomastigote metacíclico en las heces de la vinchuca(1). Seudoquistes de amastigotes en los tejidos(2). Amastigotes diferenciándose a tripomastigotes en el seudoquiste(3). Tripomastigote en sangre(4). Tubo digestivo del triatómino(5). Epimastigote(6). Epimastigotes en división(7). Tripomastigote metacíclico(8). (Tomado de Storino 1994).

## 1.2. Consideraciones sobre el vector.

El vector de la enfermedad de Chagas pertenece a la género triatominae. Existen unas 100 especies de triatomas, 92 en regiones tropicales. De las que 52 especies que son capaces de infectarse con *T. cruzi*, 36 están en relación con habitación humana y al menos 12 son vectores comprobados, todos ellos hematófagos. Los triatomas tienen un ciclo salvaje, un ciclo semidoméstico y un ciclo doméstico, que pueden depender de los diferentes triatomas, ligándose entre sí a través de animales reservorios como el tlacuache, el armadillo y la rata, y domésticos como el perro (Reyes P., 1984). El vector que frecuentemente se encuentra dentro de las construcciones domésticas de cientos de individuos en América central y México es *Rhodnius prolixus*. Sin embargo este no es el único, todas las especies de Triatominae son vectores potenciales de *T. cruzi*, pero los

factores más importantes que determinan su capacidad de transmisión son: un intervalo corto entre la alimentación y la defecación, la adecuación para vivir en habitaciones humanas, el alto grado de antropofilia y su amplia distribución geográfica. Por ello, de 27 especies conocidas en México, sólo unas cuantas tienen importancia epidemiológica y son 18 las que se han encontrado infectadas naturalmente (Velasco O , 1994).

### **1.3. Descripción de la enfermedad de Chagas.**

En la enfermedad de Chagas se distinguen las siguientes fases de infección: Fase aguda; se describe como periodo de incubación asintomático (4 a 10 días). Los primeros hallazgos se presentan en el sitio de inoculación como el signo de Romaña (complejo oftalmoganglionar) o bien chagomas, cuando la inoculación ocurre en la piel de otras partes del cuerpo. La fiebre, es el signo más importante en esta etapa y se presenta en 95% de los casos. Fase indeterminada; se caracteriza por la seropositividad en un individuo asintomático. El electrocardiograma y radiografía del corazón, esófago y colon aparecen normales. Puede extenderse por 10 - 20 años. Fase crónica; se manifiesta usualmente como enfermedades cardiacas en personas de 20 a 50 años de edad (Arritmias, Insuficiencia Cardíaca Congestiva, etc.). Las megavíceras (megaesófago y megacolon) son frecuentes en algunas regiones de Brasil. En México se han descrito varios casos de cada una de estas entidades clínicas en los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Jalisco y Tabasco (Velasco O.C , 1992)

### **1.4. Importancia de la enfermedad.**

Por mucho tiempo se ha especulado sobre la importancia de esta enfermedad en nuestro país. Aún existe diferencia de opiniones al respecto. Desde las que la consideran un padecimiento raro, hasta las que la asumen como un importante problema de salud pública (Velasco y col 1992). La enfermedad de Chagas es un padecimiento exclusivo de América Latina y tiene un gran impacto sobre la salud pública debido a su amplia distribución geográfica, a la elevada

prevalencia de la enfermedad, así como repercusiones y secuelas clinopatológicas en el humano. Esto es, la enfermedad produce frecuentemente invalidez cardiaca durante la etapa más productiva.

### **1.5. Epidemiología y diagnóstico.**

En los últimos años, se han descrito alrededor de 300 casos humanos de infección por *T.cruzi* en nuestro país. La gran mayoría de los casos han ocurrido en regiones que se encuentran localizados en la vertiente del Océano Pacífico, desde el Estado de Sonora hasta el de Chiapas. La miocardía chagásica, es una entidad escasamente reconocida en nuestro país. Con respecto a la presencia de megaesófago y megacolon chagásico, se han descrito casos en los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Jalisco y Tabasco

El diagnóstico de esta enfermedad puede realizarse con detección de anticuerpos contra *T.cruzi* en suero. El hemocultivo y el xenodiagnóstico son pruebas confirmatorias

### **1.6. Heterogeneidad biológica de *T.cruzi*.**

La especie *T.cruzi* se comporta como un grupo biológico heterogéneo. La heterogeneidad de *T.cruzi* se manifiesta de varias formas, como lo son su infectividad, tropismo al tejido y susceptibilidad a drogas. La heterogeneidad de las propiedades biológicas en *T.cruzi*, es determinada por su variabilidad genética (De Luca D'Oro, et al., 1993). Donde la existencia de marcadores de genes estructurales nucleares (enzimas) y DNA extranuclear (DNA del cinetoplasto) se han definido cepas de *T.cruzi*. La respuesta clínica a la infección, (Montamat E., et al., 1996), distribución geográfica (Luquetti A., Miles M, Rassi A., Rezende J, Souza A et al., 1986), y susceptibilidad a drogas como benznidazol (Pinto J., et al., 1994); son propiedades que dependen de cepas específicas. La constitución natural y reactividad biológica del hospedero, es también un factor que determina la relación huésped-parásito

### 1.7. Consideraciones sobre biología molecular de *T. cruzi*.

Dadas las características de patogenicidad de *T. cruzi*, los estudios básicos de organización y expresión de su genoma adquieren un interés biológico y biomédico. El parásito es un organismo diploide con por lo menos 20 pares de cromosomas (Henriksson Jan et al., 1990). La mayoría de los genes en tripanosomas están agrupados en "tandem". Codifican copias del mismo gen, de genes relacionados o bien genes diferentes. Los genes de un grupo particular, son separados por secuencias de regiones intergénicas cortas (100-500 pb) y son transcritos policistronicamente (Gwo-Shu L and Van der Ploeg L., 1997). Estas regiones intergénicas en los extremos 5' y 3' son diferentes en sus secuencias nucleotídicas incluso entre el mismo grupo (e.g. cadmodulina, Tschudi C., et al., 1985). Dentro de estas secuencias variantes río arriba del codón de iniciación, se hallan presentes dos bases puricas A-G que son sitio aceptor del splice, el cual está involucrado en la estabilidad del RNAm, así como en el proceso de trans-splicing (ver adelante).

Dadas las características de RNAs policistronicos, el procesamiento del RNA mensajero precursor adquiere una importancia esencial. El procesamiento consiste en la adición por trans-splicing, de una secuencia líder general de 39 nucleótidos en el extremo 5' y a la poliadenilación en la región 3' del mensajero (Stuart, Feagin y Abraham, 1989) (Fig. 2). Este procesamiento separa en RNAs independientes de la molécula precursora policistronica. Con respecto a la modificación 5 metil-guanosina (cap), característica de los genes eucariontes, se ha descrito que existe en el extremo 5' del exón líder (39 nucleótidos).

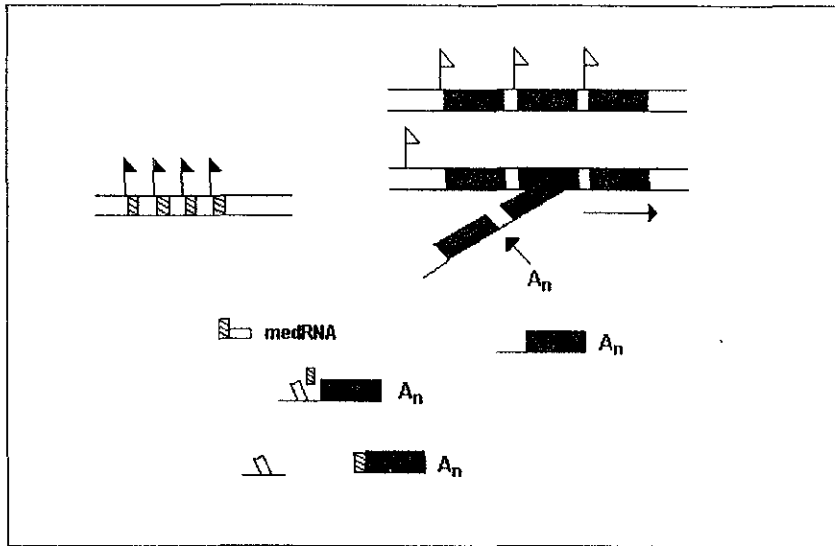


Figura 2. Trans-splicing y transcripción policistronica en tripanosomas. Arreglo en tandem de los genes del minixón (cajas de la izquierda, rayadas y cajas abiertas) transcrito apartir de promotores (banderas negras) localizados enfrente de cada minixón, generando 140 nt. med RNAs. Transcripción policistronica de los genes codificados (cajas en negro, dirección de la transcripción indicado por la flecha del extremo derecho) apartir de promotores localizados enfrente de cada arreglo génico o a cada una de las regiones intergénicas, mostrado esquemáticamente en la parte superior derecha. Los RNAs maduran por trans-splicing y por corte y adición del poli A (flecha con el símbolo A<sub>n</sub>). Los RNAs precursores se juntan por trans-splicing (esquemáticamente indicado por tres líneas de fondo) generando un RNAm maduro y un producto en forma de Y (intrones covalentemente unidos). (Adaptado de Gwo-Shu Lee, 1997).

Por otro lado, el DNA mitocondrial de estos organismos es atípicamente abundante (alrededor de 20 % de DNA total celular), y esta organizado en una estructura de malla concatenadas, llamada cinetoplasto. En el cinetoplasto se distinguen dos tipos de DNA circular: los maxicírculos de 30-50 kpb que contienen la secuencia codificadora de genes mitocondriales, y los minicírculos de 1.5 kpb que contienen secuencias codificadoras de RNA guías de edición (Benne et al., 1986). Como su nombre lo indica estos RNAs (70-90) guían los cambios editados sobre el RNA cinetoplastico. Estos cambios se dan post-transcripcionalmente en el RNA mitocondrial. La adición y remoción de uridinas internas al RNA genera

algunos de los codones de iniciación o terminación, así como, marcos de lectura con sentido para traducción.

Nuestro grupo de trabajo tiene interés básico en *T. cruzi*, y se ha enfocado al estudio de genes codificadores de moléculas ribosomales.

### 1.8. El ribosoma.

El ribosoma es un complejo de proteínas y RNA, compuesto por dos subunidades. El coeficiente de sedimentación de los ribosomas eucarioticos es de 80S, y el de las subunidades de 40S y 60S. La subunidad pequeña (40S) contiene la molécula RNAr tipo 18S (1.9 kb) y 30 proteínas. La subunidad grande (60S) contiene las moléculas de RNA 5S (120 b), 5.8S (156 b) y 28S (4.7kb), así como 50 proteínas (fig.3)

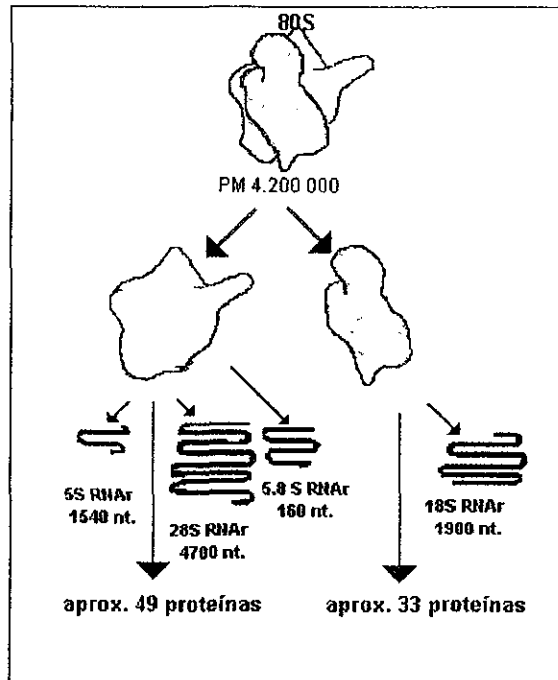


Figura 3. Composición estructural del ribosoma eucariote. "S" indica el valor del coeficiente de sedimentación en ultracentrifuga (nt., nucleotido). (Tomado de Alberts, 1994)



La biogénesis del ribosoma requiere la acumulación equimolecular de sus componentes moleculares: RNAs y proteínas ribosomales. Resulta de especial interés que en la síntesis de los componentes ribosomales de células eucarióticas participan los tres tipos de RNA polimerasas (ver mas adelante). Las partículas ribosomales se ensamblan en el nucléolo (alrededor de los genes codificadores de RNAr) y posteriormente se transportan al citoplasma celular.

### **1.9. RNA ribosomal en eucariotes.**

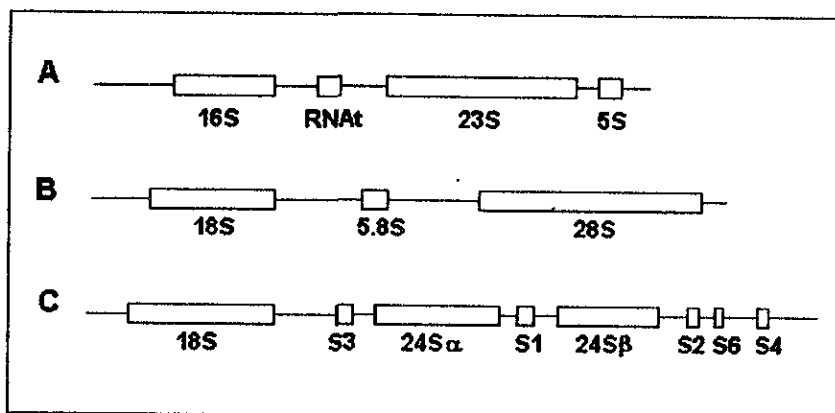
El RNA ribosomal eucariote se transcribe por la RNA polimerasa de tipo I. El transcrito primario es una molécula precursora de 45S, que al ser procesada genera las tres moléculas maduras de RNAr (18S, 5.8S, y 28S). El RNAr 5S es sintetizado en una unidad de transcripción independiente y extranucleolar por la RNA polimerasa III. Las moléculas precursoras de RNAr, que emergen de las RNA polimerasas, son empaquetadas con proteínas específicas. La nucleolina se destaca en ser una de las primeras proteínas que se unen al RNA precursor. Es por ello considerada como un marcador de los transcritos nacientes de RNAr (Weisenberger D. y Scheer U., 1995). Los niveles de nucleolina se correlacionan con la velocidad de síntesis de RNAr (Larson E., Zahradka P., Sells H., 1991).

Los genes codificadores de RNAr están reiterados de cientos a miles por núcleo, y se encuentran agrupados en cromosomas específicos separados por regiones no transcritas. Como ya se mencionó este RNA precursor madura por cortes internos que liberan las secuencias transcritas internas.

### **1.10. Procesamiento del RNAr de la subunidad mayor.**

En células procariontes como *E.coli*, la subunidad ribosomal mayor contiene las moléculas RNAr 5S y 23S (fig.4.A), esta última molécula posee secuencias en su extremo 5' que corresponden al RNAr 5.8S eucariótica. En cambio las moléculas RNAr 5.8S y 28S presentes en la subunidad mayor de eucariotes, forman parte del complejo discontinuo de RNA. Esta situación se da

en el DNA ribosomal debido a la presencia de espaciadores transcritos internos propios de las células eucarióticas. El gen 5.8S RNAr se separa de los genes 18S y 28S por dos secuencias intergénicas de tamaño y secuencia variable, fig. 4.B. El procesamiento del RNAr precursor eucariontico se liberan las secuencias internas (espaciadores transcritos) Se han descrito procesamientos adicionales al RNAr de la subunidad mayor en otros grupos de organismos. El caso de mayor complejidad hasta ahora reportado es el ribosoma de *Euglena gracilis*, cuyo de la subunidad mayor contiene 14 moléculas RNA además del 5S (Schanare M. etal., 1990). En *Acanthamoeba castellani* la molécula mayor de RNAr consiste en un agregado de tres especies RNAs, las cuales están unidas por puentes de hidrogeno (Stevens A. y Pachler P., 1972). En el caso los tripanosomátidos se ha descrito un componente de RNAr multifragmentado de siete moléculas independientes Estas moléculas se encuentran codificadas en módulos génicos separados por espaciadores transcritos (Hernández R., 1993).



**Figura 4.** Organización genómica de la unidad de RNA ribosomal de *E.coli* (A), *Xenopus laevis*(B), y *Trypanosoma cruzi* (C).

Nuestro laboratorio ha contribuido en el área de RNAr con el aislamiento y caracterización del RNAr y sus genes, en *T.cruzi*.

En tripanosomas los genes ribosomales (RNAr) son transcritos en unidades grandes de transcripción, las cuales están agrupadas en tandem en 2 ó 3 cromosomas (rev. por Vanhamme y Pays, 1995) Estas unidades, además de codificar para los RNAr 18S y 5.8S, contienen la región codificadora de un RNAr 28S atípicamente procesado como dos moléculas grandes (24S $\alpha$  y 24S $\beta$ ) y cuatro moléculas de RNA pequeñas de 220, 180, 140, 70 nucleotidos respectivamente (Hernández, Nava y Castañeda, 1983) (Fig 4.c).

El DNA ribosomal que codifica para el RNA 5S se localiza en un locus independiente a la unidad de transcripción. Aunque ambos loci se encuentran reiterados, existen 16 veces más copias del gen del RNAr 5S (Hernández-Rivas et al., 1992) que de la unidad principal de transcripción, que está repetido unas cien veces por núcleo (Castro, Hernández y Castañeda, 1980). Estas particularidades hacen importante el estudio del ribosoma de *T.cruzi*, ya que podría revelar nuevas interacciones del RNAr con las proteínas ribosomales y quizá hasta nuevos modelos de interacción del ribosoma con el RNAm

### **1.1.1. Proteínas Ribosomales.**

La proteínas ribosomales se clasifican en base a dos características. la primera depende de la subunidad en la que se encuentra, L (componente de la subunidad grande, "large") o S (componente de la subunidad pequeña, "small"); y la segunda de acuerdo a su patrón electroforético en geles de dos dimensiones.

La mayoría de las proteínas ribosomales son básicas. Existe un grupo menor de proteínas ribosomales ácidas, llamadas proteínas P debido a que son fosforiladas (P1, P2, P0, Wool I G. et al., 1995). En ningún tripanosomatideo se ha hecho un análisis electroforético bidimensional que indique la complejidad de proteínas ribosomales Este no es el caso de las proteínas ácidas donde (quizá por ser muy antigénicos) se ha hecho más trabajo. En *T.cruzi* se expresan al menos cuatro tipos de proteínas P ácidas: TcP0, TcP1, TcP2  $\alpha$ , TcP2  $\beta$  (Levin J M.,etal , 1993) El interés biomédico de estas proteínas es la característica inmunogénica, principalmente de TcP0, en enfermedades infecciosas producidas por *Leishmania* y

*T. cruzi*, y en lupus eritematoso sistémico. A diferencia de las proteínas básicas, las proteínas ribosomales ácidas se encuentran repetidas varias veces dentro de la subunidad ribosomal mayor.

### **1.12. Síntesis y organización génica de las proteínas ribosomales.**

Los genes codificadores de las proteínas ribosomales se transcriben por la RNA polimerasa de tipo II. Como cualquier proteína celular los RNAs mensajeros son traducidos y las proteínas ribosomales son transportadas hasta el nucleolo donde finalmente se ensamblan con el RNAr. Las proteínas ribosomales ensambladas en las subunidades ribosomales 40S y 60S son relocalizadas en el citoplasma (Wool et al, 1995)

La mayoría de los genes de proteínas ribosomales están dispersos individualmente por todo el genoma eucariótico, incluyendo cromosomas sexuales de vertebrados como es el caso de dos alelos codificadores para la proteína ribosomal S4 (RPS4X y RPS4Y) (Fisher, 1990). Las levaduras son los organismos donde se ha hecho más investigación sobre biología molecular de proteínas ribosomales. Se ha llegado a determinar la presencia de dos copias génicas funcionales en la mayoría de estas proteínas. Cada copia contribuye al cantidad total de RNAm presente en la célula, aunque sus niveles de expresión pueden diferir significativamente (Abovich et al. 1985, Leer et al. 1985). En estas células se han descrito los siguientes elementos génicos relacionados con la transcripción de proteínas ribosomales: una caja TATA, una región rica en TC (necesaria para una transcripción eficiente), y dos elementos de activación "upstream activating sequences" UAS. Los elementos UAS designadas como cajas HOMOL-1 y RPG son requeridas para la transcripción eficiente, ambas están organizadas en tandem, y se localizan generalmente a 250-450 nucleotidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Raué H. y Planta R., 1991). Las cajas HOMOL1 y RPG son sitios de unión para varios factores de transcripción (proteínas necesarias para el inicio de transcripción). El factor de transcripción TUF se une a ambas cajas ya descritas, coordinando la transcripción de todos los genes de proteínas ribosomales, excepto

L3 y S33 (Vignais et al., 1987) Los genes de estas dos proteínas contienen elementos génicos UAS que son reconocidos por el factor SUF (Hamil et al., 1988). Cabe resaltar que la estructura de los genes codificadores de las proteínas ribosomales en levaduras presenta un intron dentro de la región codificadora hacia el extremo 5', como es el caso del gen RP51 (Teem, J L and Rosbash, M., 1983).

### **1.13. Regulación de la producción de proteínas ribosomales en eucariontes.**

El control de síntesis de las proteínas ribosomales opera en varios niveles, desde la transcripción hasta la estabilidad de la proteína. A continuación se describen los diferentes niveles de control.

#### **a) Regulación transcripcional.**

Bajo condiciones de crecimiento de equilibrio se producen cantidades equimoleculares de cada una de las proteínas ribosomales, independientes del número de copias génicas. El control transcripcional es un mecanismo que regula los niveles de expresión diferencial entre cada una de las copias génicas. La transcripción de los genes para proteínas ribosomales varía coordinadamente con las condiciones fisiológicas, como son: variación del ritmo de crecimiento después de cambios de nutrientes (Donovan y Pearson 1986; Herruer et al.1987), durante un cambio en la fuente de carbono (Shi Y. y Tyler B 1991), o posterior a un choque térmico (Kim y Warner 1983, Herruer et al. 1988). En células de mamíferos no es común el control transcripcional en la producción de proteínas ribosomales (Roué H.A , 1991).

#### **b) Regulación post-transcripcional**

Se ha descrito regulación en el procesamiento del transcrito primario de la proteína. Depende del proceso de splicing y de la estabilidad del RNAm. Un ejemplo en la literatura de regulación por splicing es el reportado para el mensajero codificador de la proteína L32 de levadura. En este caso la presencia de una dosis génica adicional se correlaciona con el aumento en la concentración del precursor

mensajero no procesado. Incluso se piensa que una fracción de la proteína ribosomal libre pudiera interferir con el procesamiento de su propio mensajero, y de esta forma regular su propia síntesis. Este proceso es muy similar al tipo de regulación de síntesis de proteínas ribosomales en bacterias (Dabeva et al. 1986).

La estabilidad de la mayoría de los RNAm esta determinada por la susceptibilidad a RNAasas (dependiente de la estructura primaria del transcrito) o bien por la afinidad del mRNA a su proteína. En el caso de mensajeros para proteínas ribosomales se ha descrito que su estabilidad cambia en respuesta a los niveles de nutrientes; velocidad de crecimiento; infección viral; agentes químicos y cambios de temperatura (Ross J., 1996). En *Xenopus* el control postranscripcional regula los niveles de RNAm de proteínas ribosomales durante la embriogénesis y maduración del oocito (Amaldi F. et al 1995) En mamíferos no se ha llegado a establecer, si existe éste tipo de control.

### c) Regulación traduccional

Este tipo de regulación se ha reportado en eucariontes superiores como *Drosophila*, *Xenopus* y ratón. La regulación traduccional se lleva acabo por distribución del mRNA de la proteína ribosomal entre los polisomas y complejos ribonucleoproteicos solubles. El RNAm en las ribonucleoproteínas no esta disponible para su traducción, en cambio el que se encuentra dentro de los polisomas es utilizable para la síntesis de nuevas proteínas. La distribución del RNAm para la proteína ribosomal entre los dos compartimientos es rápido, sin alterar la estabilidad del mensajero, por consiguiente este tipo de control permite la adaptación rápida de la célula a estímulos extracelulares (Amaldi F.,1995). En *Xenopus* y varios sistemas de mamíferos, los cambios mencionados de distribución poliribosomal se han observado después de variaciones en la velocidad de crecimiento. Durante la fase logaritmica los transcritos se ubican mayoritariamente en los polisomas. La regulación traduccional en proteínas ribosomales tiene la característica de estar íntimamente relacionada con la actividad de síntesis de proteínas en la célula. En todos los sistemas eucariontes superiores, el control a

nivel traduccional es un mecanismo importante de regulación de la síntesis de proteínas ribosomales

d) Regulación post-traduccional.

En eucariontes, esta regulación se caracteriza por la degradación de proteínas ribosomales durante una sobreproducción (Larson E. et al. 1991). Si se presentan la reducción transcripcional del componente ribosomal de RNA se da un control postraduccional de las proteínas ribosomales. La evidencia indica que las proteínas ribosomales son inestables cuando no son inmediatamente ensambladas dentro de las partículas precursoras ribosomales (Xenopus, Pierandrei-Amaldi et al 1985) Este tipo de control se ha reportado también en levaduras para la mayoría de las proteínas ribosomales, excepto las proteínas ribosomales ácidas donde se tiene una poza de proteínas libres en el citoplasma (Raué A. y Planta R J., 1991). En eucariontes superiores intervienen una variedad de condiciones fisiológicas en la regulación postraduccional de proteínas ribosomales.

**1.14. Consideraciones particulares sobre el tema de estudio.**

Con el interés global de estudiar la biosíntesis ribosomal en *T. cruzi*, esta tesis contiene mi contribución a la línea sobre proteínas ribosomales de *T. cruzi*. En particular se trabajó con la proteína ribosomal S4.

La PRS4 es una proteína básica, hidrofílica de aproximadamente 30,000 Da, contiene de 261 a 283 aminoácidos. En su estructura primaria existe un mayor número de aminoácidos básicos (aproximadamente 30% más que los residuos ácidos) en especial en los residuos próximos al extremo amino (Braun et al., 1994; Synetos, Dabeva y Warner, 1992; Garyathri, Devi, Chan y Wool, 1989).

Se cree que esta proteína se encuentra en la interfase de interacción entre las dos subunidades ribosomales (Uchimi, Kikuchi y Ogata, 1986), así mismo en el área de interacción codón-anticodón (Mundus et al., 1993). Todas estas observaciones sugieren que la PRS4 participa en la asociación de las subunidades ribosomales, así como en el reconocimiento del mRNA y codón-anticodón. Por

otra parte esta proteína ribosomal ha mostrado características interesantes en varios organismos. En humanos, existen dos genes que transcriben para la PRS4, uno en el cromosoma X (PRS4X) y otro en el cromosoma Y (RPS4Y). Ambos difieren en 19 nucleótidos de su secuencia codificante. El PRS4Y es localizado en la región determinante del sexo, en el cromosoma Y; y el PRS4X escapa de la inactivación X (Fisher et al., 1990) La proteína S7 es el producto homólogo en levadura a la proteína S4 de otros eucariotes. La proteína ribosomal S7 (RPS7) se encuentra codificada en dos genes distintos RPS7A y RPS7B. La región codificadora de estos dos genes solamente difiere entre sí 14 nucleótidos. Ninguno de estos cambios afecta la estructura primaria de la proteína. Los genes contienen intrones distintos, de 257 y 269 nucleótidos para la PRS7A y PRS7B, respectivamente. Estos genes son esenciales en *Saccharomyces cerevisiae*. La viabilidad celular puede sin embargo mantenerse con solo una copia génica, aunque la carencia de uno de ellos disminuye la tasa de crecimiento (Synetos, Daveba y Warner, 1992).

Dadas estas consideraciones hechas sobre la proteína ribosomal S4, parece adecuado iniciar su estudio en el parásito *T.cruzi*.



## *CAPITULO II*

# *OBJETIVOS*

**Objetivo General.**

Caracterizar la organización génica y expresión del gene que codifica para la proteína ribosomal S4 de *T.cruzi*.

**Objetivos particulares.**

Determinar el número de copias génicas y la localización cromosomal del gen para la proteína ribosomal S4 en *T.cruzi* , mediante ensayos tipo Southern Blot.

Establecer el tamaño del transcrito para la proteína ribosomal S4 y el perfil de expresión durante la proliferación celular de *T.cruzi* , con ensayos tipo Northern Blot.

Conocer el perfil de expresión durante la proliferación celular para la nucleolina, proteína nucleolar utilizada como marcador indirecto en la regulación de la biosíntesis ribosomal.

**CAPITULO III**

*MATERIALES*

*Y*

*MÉTODOS*

### **3.1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de *Trypanosoma cruzi*.**

#### **3.1.1. Cultivos celulares.**

Se realizaron cultivos de epimastigotes de la cepa CL Brener en medio de infusión de hígado-triptosa (LIT), suplementado con suero bovino fetal al 5%. Incubándose a 28°C, hasta obtener una cuenta de parásitos de  $30 \times 10^6$  a  $40 \times 10^6$  cel/ml.

La cinética de crecimiento en medio líquido se utilizó para extracción de RNA. Se inició con parásitos en fase exponencial de crecimiento ( $45 \times 10^6$  cel/ml), los cuales fueron inoculados en 120 ml de medio LIT a una concentración inicial de  $5 \times 10^6$  parásitos/ml. Esta suspensión celular se dividió en seis cultivos, colocados en cajas de cultivo celular (25 cm<sup>2</sup> de área superficial). Uno de los cultivos se utilizó para monitorear la viabilidad y crecimiento del parásito. Para evaluar las formas morfológicas de duplicación y movilidad de los epimastigotes monoflagelares se utilizó el microscopio invertido. El crecimiento de *T. cruzi* se monitoreo mediante la cuenta celular en la cámara de Neubauer. El tiempo de generación promedio es de 24 hs. A tiempo cero y cada día transcurrido se tomó una alícuota para diluirla en una solución salina que contiene formol, la dilución realizada se cargó a la cámara de Neubauer para estimar el número de células cada 24hs.

#### **3.1.2. Extracción de DNA genómico.**

Cultivos celulares en la fase media logarítmica, fueron cosechados por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C en el rotor SS-34 Sorvall. Posteriormente las células se lavaron en Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), EDTA 0.25mM (pH 9.0), LiCl 2.5 M, Tritón X-100 4% (solución N), se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se realizó una extracción con un volumen de fenol-cloroformo (1:1), (fenol preequilibrado con Tris-HCl 0.1 M pH 8.0), enseguida se agitó y centrifugó en microcentrifuga durante 5 min. La fase acuosa se precipitó

con dos volúmenes de etanol absoluto frío, durante 10 min a 4°C y centrifugó 10 min en microcentrifuga. El DNA precipitado se lavó con etanol 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Después se resuspendió en 100µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM), y se adicionó 2µl de RNAasa pancreática (1µg/ml), incubándose durante 1h a 37°C. La concentración de DNA se determinó espectrofotométricamente por absorbancia a 260 nm.

### **3.1.3. Digestiones con endonucleasas de restricción.**

Las digestiones de DNA se realizaron empleando concentraciones de enzimas en un exceso de 5 a 10 veces, considerando las condiciones recomendadas por la casa comercial para endonucleasas de restricción (Bethesda Research Laboratories, Inc. catálogo de 1986) Se digirió 5µg de DNA genómico de *T. cruzi* cepa CL Brener (digestión: 2µl de enzima, 2µl de buffer 10X, 11µl de H<sub>2</sub>O estéril) y se incubó toda la noche. Para el Southern Blot se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI, HindIII, PstI, BamHI, ClaI y SstI. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo en un volumen de 20µl, fueron detenidas a 65°C por 5 min con 5µl de la siguiente mezcla: TBE 0.1X (Tris 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.05%), SDS 0.2%, Ficoll400 10%, azul de bromofenol 0.05% y xilen-cianol 0.05%

### **3.1.4. Extracción de RNA total.**

Los cultivos celulares de epimastigotes fueron cosechados en diferentes fases de la curva de crecimiento, por centrifugación a 5,000 rpm durante 5 min a 4°C, rotor SS-34 Sorvall. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces en solución PBS (NaCl 0.15 M, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.7 mM, pH 7.4), después de decantar la solución se guardó el botón celular a -70°C. Este material celular fue descongelado a 4°C para resuspenderlo en 500µl de solución de lisis (Tiocianato de guanidina 4 M, Citrato de sodio 25 mM pH 7.0, Sarcosil 0.5%, betamercapto etanol 0.1 M) Al homogeneizado obtenido se le adicionó 34µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.0), 1 volumen de fenol (saturado con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC) y 0.2

volumenes de cloroformo-alcohol isoamílico (29:1), en cada adición de las soluciones anteriores se agitó. Se incubó 15 min. La fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol durante 10 min en hielo seco. Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm 15 min, el sobrenadante se decantó. El precipitado obtenido se resuspendió en 100µl de solución de lisis y 100µl de isopropanol, dejándose 10 min en hielo seco. Se centrifugó, decanto y resuspendió el precipitado obtenido en 50 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. La concentración de RNA total fue calculada tomando lecturas de densidad óptica  $A_{(260\text{ nm})}$ , y observando la intensidad de las bandas del RNA ribosomal en los geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio.

Todo material de vidrio debe hornearse a 180°C por 6 hs mínimo. Las soluciones deben prepararse con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. Mantener el sistema donde se lleva acabo la extracción a 4°C y trabajar con guantes.

### **3.2 Preparación de plásmido, recuperación de inserto y marcaje radioactivo del mismo.**

#### **3.2.1.-Preparación de células competentes y transformación.**

Se hicieron cultivos de 25 ml de *E.coli* y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación. Este cultivo fue diluído 1.80 en un matraz nefelométrico (0.63 ml de cultivo inicial en 50 ml de medio luria) y se incubó a 37°C hasta obtener una  $D.O_{.600} = 0.2-0.3$ . Posteriormente el cultivo se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min a 4°C durante 30 min. Pasado este tiempo se resuspendió el botón en 1/10 volúmenes de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y se almacenó la suspensión a 4°C.

Posteriormente para la transformación, se agregaron 1-10µl de solución de DNA de plásmido a 200µl de células competentes. Se dejó reposar en hielo durante 30 min, después de lo cual se incubó a 42°C por 45 seg. Enseguida se dejó reposar a temperatura ambiente 10 min y después reposar en hielo 2 min, se adicionaron 800µl de medio Luria sin antibiótico, se incubaron las células a 37°C durante 1h. Después se tomaron 100 µl de la suspensión de células y se plaqueó en

medio NZCYM y ampicilina (conc. 50µg/ml) La suspensión celular restante se centrifugó durante 10 seg en microfuga, se decantó el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió en el líquido restante, y se plaqueó en una caja petri con medio NZCYM y ampicilina. Las cajas se dejaron toda la noche a 37°C, al aparecer colonias aisladas se almacenaron a 4°C.

### **3.2.2. Descripción de plásmido pS4-2.**

En el presente trabajo constantemente se hará referencia al inserto pS4-2, que se obtuvo en nuestro laboratorio de la búsqueda en clonas de la biblioteca de DNAc de *T.cruzi* (cepa Talahuén) (Hernández, R 1998) El tamaño del inserto es de 945 pb y puede liberarse del vector pBluescript SK- con EcoRI y KpnI. Contiene la secuencia codificadora completa para la proteína ribosomal S4 de *T.cruzi*, donde se ubica un sitio de corte para HindIII.

### **3.2.3. Preparación de plásmido a pequeña escala (minipreparación).**

Es un método de aislamiento de DNA de plásmido puro El método se basa en la resistencia del DNA superenrollado covalentemente a la desnaturalización en medio básico

Se creció un cultivo de *E.coli* en 3ml de medio Luria con ampicilina (conc. 50µg/ml) se dejó toda la noche a 37°C con agitación. Se agregó 1.5 ml de este cultivo a un tubo de microfuga, se centrifugó en microcentrifuga durante 30 seg, se desechó el sobrenadante y se repitió la operación El botón obtenido se agitó hasta desprenderlo de las paredes del tubo, y se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, Tri-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH8.0), agitando vigorosamente Posteriormente se agregó 200 µl de solución 2 (NaOH 0.2 n, SDS 1%, preparado al momento de su uso), se mezcló los tubos por inversión, hasta homogeneizar Se agregó 150µl de solución III (Acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial 11.5%), se agitó y colocó en hielo de 3 a 5 min. El tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, en microcentrifuga, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. A este último se le adicionó 1 volumen de

fenol:cloroformo (1:1), se agitó y centrifugó en microcentrifuga durante 2 min. La fase acuosa recuperada se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, mínimo 2 h, después de los cuales se centrifugó durante 10 min. El producto final se lavó con etanol 70% a -20°C, y se dejó secar al aire durante 10 min. Se resuspendió en 50µl de TE y la concentración aproximada del DNA plasmídico se determinó por comparación de la intensidad de la fluorescencia en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

#### **3.2.4. Recuperación del inserto.**

Se digirieron 6-10 µg de DNA de plásmido, en donde se encontraba el inserto de interés. La clona pS4-2 fue digerido por una digestión doble con *KpnI* y *EcoRI*, para separar el inserto del vector pBluescrip. Los productos de digestión se separaron en un gel de agarosa 0.8% en TBE (Tris-HCl, boratos, EDTA). Posteriormente se recortó la banda de interés. Se colocó en un tubo eppendorf de 500µl, en donde previamente se había hecho un orificio en la parte inferior y colocado fibra de vidrio siliconizada empaquetada en la parte inferior del tubo. Este tubo se colocó a su vez dentro de otro tubo de 1.5 ml, y se centrifugó a 6,000rpm durante 5 min. Al líquido recuperado en el tubo de 1.5 ml, se le añadió un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) se agitó y centrifugó en microcentrifuga durante 2 min. Posteriormente la fase acuosa recuperada se le agregó 1 volumen de cloroformo, se agitó y centrifugó. La fase acuosa obtenida se le adicionó dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3 M (pH 4.9). Este se dejó precipitar 2 h a -20°C, después se centrifugó en microcentrifuga durante 10 min. El botón obtenido se enjuagó con etanol 70% y se dejó secar al aire durante 10 min. Posteriormente se resuspendió en 20µl de TE y se almacenó a -20°C. La concentración aproximada se determinó mediante método electroforético



### **3.2.5. Marcaje del inserto mediante el método de “iniciador al azar”.**

El DNA empleado como sonda fue marcado con  $^{32}\text{P}$  dCTP por medio del método de iniciador al azar (Random Primer). Este método esta basado en el marcaje de DNA mediante incorporación de dioxicitocina trifosfato  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  (marcado radioactivamente), a partir de hexanucleótidos iniciadores no específicos y el fragmento klenow de la DNA polimerasa (DNA pol I). La reacción Random Primer se llevó acabo con 15 ng de inserto en un volumen de 12  $\mu\text{l}$  y se desnaturalizó a  $96^\circ\text{C}$  durante 10 min. Posteriormente se agregaron 3 $\mu\text{l}$  de la mezcla de dATP, dGTP, dTTP, 2 $\mu\text{l}$  de amortiguador de reacción, 5 $\mu\text{l}$  de dCTP- $[\alpha]$ - $^{32}\text{P}$  (50 $\mu\text{Ci}$  totales) y 2 $\mu\text{l}$  de polimerasa klenow. Esta reacción se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 1h. Posteriormente se paró la reacción con 2 $\mu\text{l}$  de EDTA 0.2M (pH 8.0) y se llevó a un volumen final de 125  $\mu\text{l}$  con TE. Enseguida se purificó la sonda en una columna de Sephadex G-50 hidratada y empaquetada en TE, centrifugando 5 min a 2,000 rpm y colocando un tubo de microfuga debajo de la columna para recuperar la sonda y se determinó la radioactividad incorporada mediante un contador de centelleo (Serenkoff). La sonda marcada se desnaturalizó por calentamiento a  $96^\circ\text{C}$  durante 12 min.

### **3.3. Caracterizaciones génicas.**

#### **3.3.1. Experimento tipo Southern Blot.**

El DNA genómico digerido con las endonucleasas de restricción fue fraccionada por electroforesis en el gel horizontal de agarosa 0.8% en TBE. El gel de 5mm de espesor fue sometido a una diferencia de potencial de 70-80 volts. Las bandas de DNA fueron visualizados después de teñir el gel con 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio, en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta. El tamaño de los fragmentos de restricción del DNA fago lambda digerido con endonucleasa *HindIII* (Bethesda Research Laboratories, Inc. catálogo de 1986). Posteriormente el DNA de los geles fue transferido de acuerdo al método descrito.

por Southern (Southern, E M., 1975) a una membrana de nylon. El gel tipo Southern se enjuagó con agua desionizada y se colocó en solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) en agitación durante 50 min. Pasado esto el gel se enjuagó y se colocó en dos cambios de 5min. Pasado esto el gel se enjuagó y se colocó en dos cambios de 5min de solución neutralizante (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5M pH 7.2, EDTA 0.1 mM) en agitación. El gel se enjuagó y se colocó en una cámara de transferencia con SSC 10X (NaCl 3M, citrato de sodio 0.3 M) en donde el DNA separado se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon Hybond (Amersham Ltd., U.K), previamente colocada sobre la cara inferior del gel, durante toda la noche. Posteriormente la membrana fue retirada, se dejó secar a temperatura ambiente y horneó a 80°C durante 2 hs

### **3.3.2. Hibridación.**

La membrana se prehibridó durante dos horas en 10 ml de solución de hibridación [formamida 50%, Denhardt's 4X(albúmina bovina sérica 0.02%, ficoll400 0.002%, PVP-40 0.002%), SDS 0.2%, EDTA 2 mM, amortiguador de fosfatos 120 mM, SSC 2X], a 37°C en un horno de hibridación. Posteriormente se hibridó con  $10 \times 10^6$  cpm de DNA marcado con  $^{32}\text{P}$ , en 10 ml de solución de hibridación, durante toda la noche. Después se hicieron tres lavados de 30 min a 42°C con una solución de SSC 2X y SDS 0.1%. Al término de los anteriores lavados se expuso la membrana a una placa fotográfica con pantalla intensificadora durante 12 hs a -70°C

### **3.3.3. Northern Blot de RNA total de *T.cruzi*.**

Se cargaron 8 µg de RNA total de *T.cruzi* en un gel de agarosa a 1% en amortiguador MOPS/EDTA 1X y al 6% de formaldehído. Se aplicó una diferencia de potencial de 80 volts. El RNA se transfirió a una membrana de nylon Hybond, previamente colocada sobre la cara inferior del gel, durante toda la noche.

La prehibridación se hizo en un volumen de 10 ml de solución de hibridación a 37°C durante 2 hs. La hibridación de inserto marcado se llevó a cabo en 10 ml de solución de hibridación con 20 ng de inserto marcado con 50  $\mu\text{Ci}$  de dCTP-[ $\alpha$ ]- $^{32}\text{P}$ , durante toda la noche. Posteriormente la membrana se lavó con una solución de SSC 2X y SDS 0.1%, tres veces durante 30 min a 55°C. La membrana se expuso a placas fotográficas durante 24 h a -70°C.

### **3.4. Cariotipo molecular.**

#### **3.4.1. Preparación de bloques de agarosa para geles de gradiente en pulso.**

Cultivos de epimastigotes de la cepa CL Brener de *T. cruzi* (aprox  $2 \times 10^9$  células) fueron centrifugadas a 6,000 rpm durante 10 min a 4°C, rotor HB4 Duppont. El botón se enjuaga dos veces con 10 ml de PBS y centrifugado nuevamente 10 min a 6,000 rpm a 4°C. Las células intactas obtenidas en el botón, fueron resuspendidas en 2 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1% fundido en PBS mezclándose muy bien con la ayuda de una pipeta pasteur, procurando no hacer burbujas. Las células con agarosa se vaciaron en un molde donde se hacen los bloques, lo más rápidamente posible. Los bloques se dejaron solidificar 15 min a 4°C, posteriormente se sacaron los moldes con la ayuda de una espátula y se colocaron en la solución de lisis (Sarcosil 1%, EDTA 0.5 M pH 8.0 y proteinasa K 1 mg/ml), se incubaron a 50°C durante 48 hs, con el fin de lisar las células in situ por difusión de los componentes de la solución de lisis. Una vez transcurrido este tiempo los bloques de agarosa se enjuagaron dos veces con TE y se almacenaron a 4°C con TE hasta su uso.

#### **3.4.2. Separación del DNA cromosomal por electroforesis de campos alternos transversos (TAFE) (Manual de equipo TAFE. The gene Life System Beckman).**

El sistema electroforético utiliza cuatro electrodos que establecen una orientación periódica del campo eléctrico, y cambia en lapsos de tiempo su

dirección, permitiendo que el DNA migre en zigzag de forma transversal (término referido a la orientación del campo con respecto al plano del gel). Estos electrodos son colocados paralelamente en fase al gel, que se encuentra balanceando verticalmente en el buffer de depósito.

Los bloques de agarosa contenían aproximadamente  $2 \times 10^8$  parásitos y fueron colocados en los pozos del gel de agarosa 1%, posteriormente estos fueron sellados con agarosa 1% (disuelto en TBE 1X), procurando que los pozos no quedaran atrapada ninguna burbuja de aire, ya que esto infiere con el corrimiento electroforético de los cromosomas. Se usó TBE 1X como buffer de corrida. Las condiciones de electroforesis fueron: pulsos de 3min a 280 mA y pulsos de 8 min a 400 mA por 24 hs a 14°C. Los cromosomas de *Sacharomyces cerevisiae* de la cepa YNN295 fueron usados como marcadores de tamaño (Pharmacia Biotech, Accebsolab 1995) Una vez concluída la corrida de cromosomas se visualizaron mediante la transiluminación de los geles (previamente teñidos con bromuro de etidio, 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) con luz ultravioleta de onda corta. El gel fué transferido a una membrana de Nylon después de ser desnaturalizado con NaOH 0.4 M durante 1 h y neutralizado con NaCl 1.5 M y Tris 1 M pH 7.0 durante 30 min con al menos dos cambios. La membrana de Nylon fue horneada durante 2 h a 65°C para fijar a la membrana los ácidos nucleicos. La prehibridación e hibridación de la membrana se efectuó en las mismas condiciones que las descritas para el "Southern Blot".

## *CAPITULO IV*

# *RESULTADOS*

#### 4.1. Análisis del gen de la proteína ribosomal S4 en la cepa CL Brener *T.cruzi*.

Con el propósito de conocer el número de copias génicas y construir posibles arreglos genicos en mapas de restricción codificante de la proteína S4, se cortó el DNA genómico de *T.cruzi* (CL Brener) con siete endonucleasas de restricción: *Bam*HI, *Cl*aI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I y *Sst*I. Se realizó un ensayo tipo Southern blot del DNA genómico digerido con una o dos de las endonucleasas de restricción ya mencionadas, y se hibridó con el inserto de DNAc para la proteína ribosomal S4 (clona pS4-2) marcada radioactivamente.

En la figura 1A se muestran los fragmentos de la digestión enzimática, separados en gel de agarosa 0.8%. En la figura 1B se muestra el Southern blot hibridado con el DNAc de S4 marcada radiactivamente, donde se pueden distinguir dos diferentes bandas con *Bam*HI (6.2 Kpb y 5 4kpb) y *Pst*I (7.2Kpb y 4.5 Kpb) (carril 3 y 4 respectivamente). Una sola banda se denota con *Sst*I (11 kpb), *Eco*RI (7.4 Kpb) y *Cl*aI (8.7Kpb), cabe mencionar que estas dos últimas resaltan entre las demás bandas por presentar señales de hibridación notoriamente marcadas. Por último tres bandas de hibridación se observan con *Hind*III: 0.830 kpb, 3.7 kpb y 4.6 kpb.

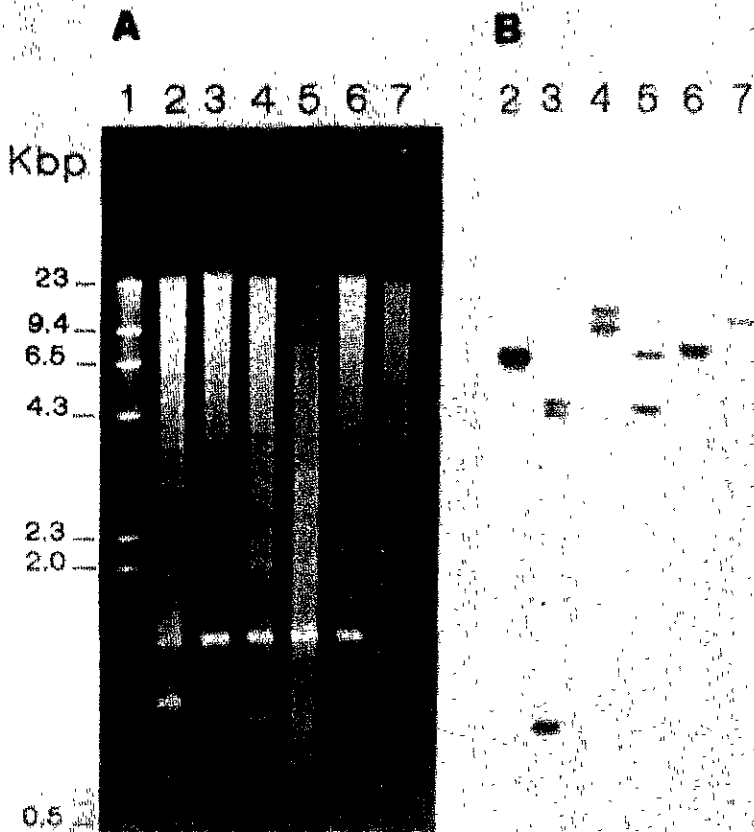


Figura 1. Southern blot de DNA genómico de *T. cruzi*. A. Perfil electroforético del DNA genómico digerido con *EcoRI* (carril 2), *HindIII* (carril 3), *BamHI* (carril 4), *PstI* (carril 5), *ClaI* (carril 6), y *SstI* (carril 7). Se utilizó como marcador de tamaño DNA de fago lambda digerido con *HindIII* (carril 1). B. Patrón de hibridación del DNAc de la proteína ribosomal S4 al DNA genómico digerido con enzimas de restricción.

Con el fin de ampliar nuestra información y construir posibles arreglos génicos en mapas de restricción para la proteína S4, se seleccionaron las endonucleasas de restricción *EcoRI*, *SstI*, *ClaI*, para realizar digestiones enzimáticas sencillas y dobles con cada una de ellas. El DNA digerido se cargó en gel de agarosa donde la corrida electroforética duro más tiempo, reflejándose en el Southern blot el patrón de digestión sencilla con *EcoRI* que muestra claramente la presencia de dos bandas de 7.8 kpb y 7.6 kpb (carril 1, figura 2). De las digestiones dobles resultaron las siguientes señales de hibridación: *EcoRI-SstI* 6 kpb y 5.6 kpb, con *EcoRI-ClaI* 6.3 kpb y 6.0 kpb, y por último con *SstI:ClaI* se ven dos fragmentos de digestión de 8.2kpb y 8 0 kpb, figura 2. Por la anteriormente descrito se sugiere la presencia de dos alelos para la proteína ribosomal S4 en el genoma de *T.cruzi*.



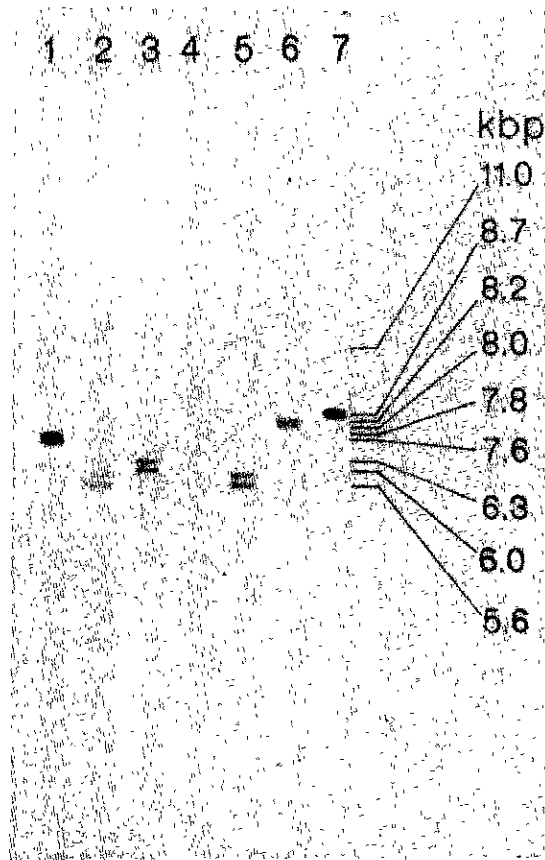
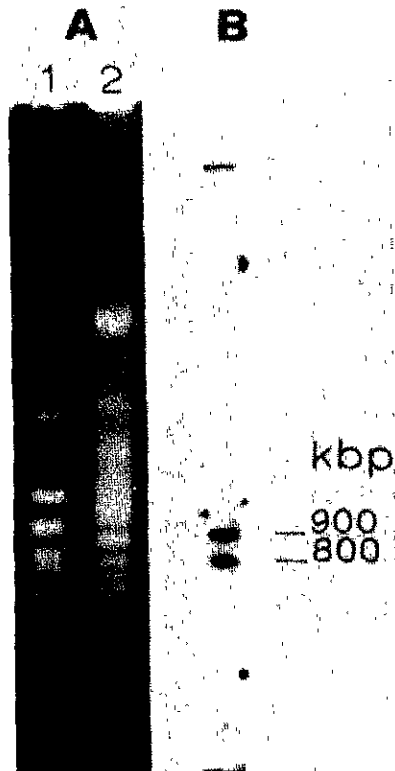


Figura 2. Análisis de Southern Blot del DNA genómico digerido e hibridado con el DNAC para la proteína S4. Se realizaron ensayos de digestión enzimática dobles y sencillas: *EcoRI* (carril 1), *EcoRI-SstI* (carril 2 y 5), *EcoRI-ClaI* (línea 3), *SstI* (carril 4), *SstI-ClaI* (carril 6) y *ClaI* (carril 7). El tamaño de los fragmentos fue estimado con el DNA del fago lambda digerido con *HindIII*.

#### **4.2. Localización cromosomal.**

Con el objetivo de determinar la localización cromosomal de la proteína ribosomal S4, conjuntamente al análisis del gen para PRS4 con endonucleasas de restricción, se realizó un análisis de la organización genómica al separar de DNA cromosomal. Mediante electroforesis de campos alternos transversos, bajo las condiciones especificadas dentro de la sección metodológica. Posteriormente la tinción con Bromuro de Etidio y transiluminación con UV , permitió detectar en el gel la presencia de varias bandas de DNA cromosomal, figura 3A. El DNA cromosómico fue transferido a una membrana de nylon mediante el ensayo tipo Southern blot e hibridado con el DNAc de la PRS4 marcada radiactivamente. Se visualizaron claramente dos bandas de hibridación de aproximadamente 800 y 900 kpb, figura 3B. Estos resultados fortalecen la hipótesis de dos alelos que codifican para la proteína en estudio y que están presentes en diferentes cromosomas.



**Figura 3. Localización cromosomal de la proteína S4.** A. DNA cromosomal de *T. cruzi* (carril 2) separado por electroforesis de campos alternos transversos (TAFE). Se utilizó como marcador de tamaño los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* (carril 1). B. El gel transferido a una membrana de nylon se hibridó con el DNac para la proteína ribosomal S4.

### 4.3. Expresión del gen para la proteína ribosomal S4.

Con el interés de determinar el tamaño del transcrito para la proteína S4 y buscar diferencias de expresión en diferentes fases de crecimiento, se realizó un seguimiento del crecimiento de epimastigotes en cultivo, la curva de crecimiento se observa en la figura 4. Se cosecharon las células de epimastigotes en fase logarítmica y en fase estacionaria, posteriormente se procesaron para la extracción de RNA total. Se utilizó el RNA total para el ensayo tipo Northern blot, y se hibridó con la sonda marcada radioactivamente, figura 5. El tamaño del transcrito para la proteína ribosomal S4 es de aproximadamente 1kb. En la figura 5 se correlaciona la cinética de crecimiento con la cantidad de equilibrio del RNAm de la proteína ribosomal S4. Se observa que la concentración de equilibrio (steady-state) no varía con la fase de desarrollo de *T.cruzi*.

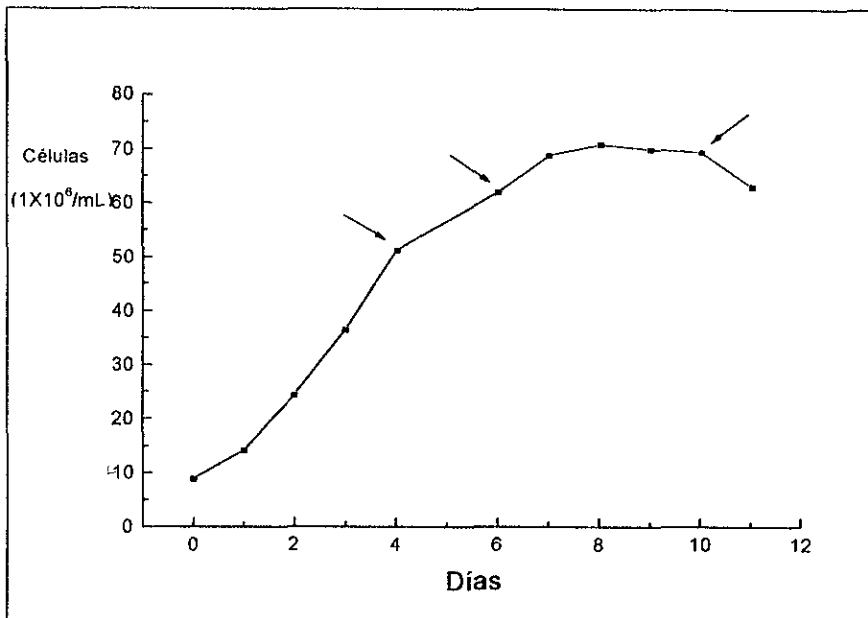
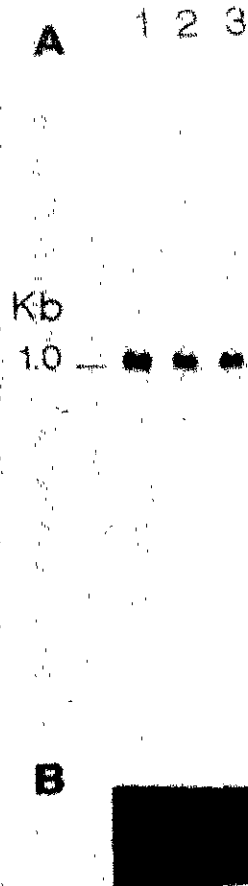


Figura 4. Curva de crecimiento de *T.cruzi*. Se cuantificó el número de células epimastigotes, por conteo en cámaras de Neubauer en diferentes tiempos de incubación. Las flechas indican los eventos de cosecha en tres cultivos paralelos.



**Figura 5. Northern Blot de RNA total de *T. cruzi*.** A. Analisis de expresion del gen para la proteina ribosomal S4 en *T. cruzi*. Se cargo 8µg de RNA total de epimastigotes en fase logaritmica (carril 1) y fase estacionaria (carril 2 y 3). B. Control de cargado de RNA ribosomales teñido con bromuro de etidio.

#### **4.4. Nucleolina marcador indirecto de la biogénesis ribosomal.**

La nucleolina es una proteína nucleolar que participa en la biogénesis del ribosoma. En varios sistemas experimentales se ha encontrado que los niveles de RNAm codificador de nucleolina varía en correlación a la biogénesis ribosomal (Orrick et al 1973; Ballal et al. 1975; Bouche et al. 1987) Con el interés de utilizar un marcador indirecto de la regulación biogenética ribosomal, durante el estado proliferativo celular de *T. cruzi*, se hibridó una sonda de nucleolina de *T. cruzi* a una membrana de los experimentos anteriores donde se había analizado RNA total de los diferentes fases de la curva de crecimiento. En el Northern blot se observa que existe más de un transcrito para la nucleolina, estos transcritos tienen un tamaño aproximado de 4.1 kb, 3.4 kb, 3.15 kb y 1.3kb.

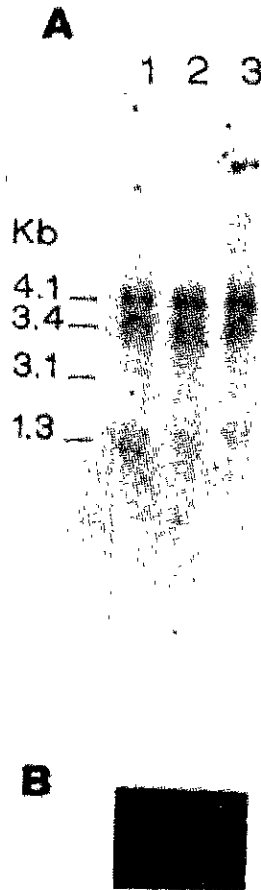


Figura 6. Northern blot de RNA total de *T. cruzi*. Análisis de expresión del gen para la nucleolina en epimastigotes en fase logarítmica (carril 1) y fase estacionaria (carril 2 y 3). **B** Control de cargado de RNA total teñido con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos fue estimado con el RNA "ladder" de BRL.

## *CAPITULO V*

# *DISCUSIÓN*

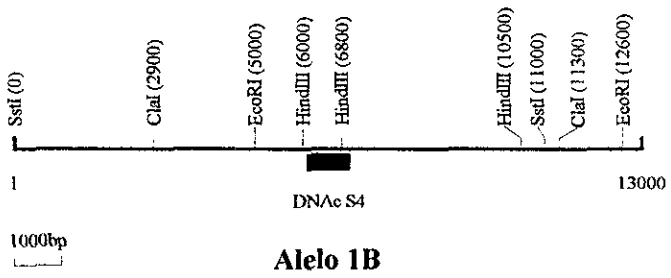
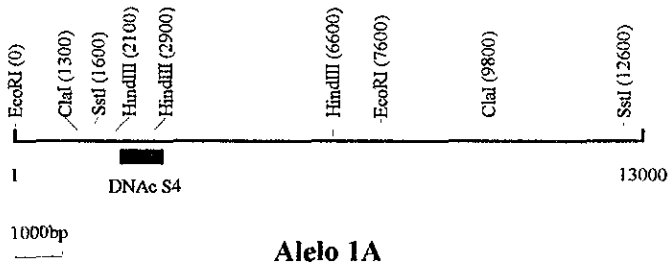


### 5.1. Dos genes para la proteína ribosomal S4.

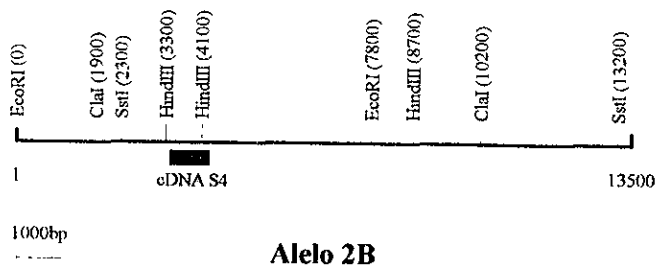
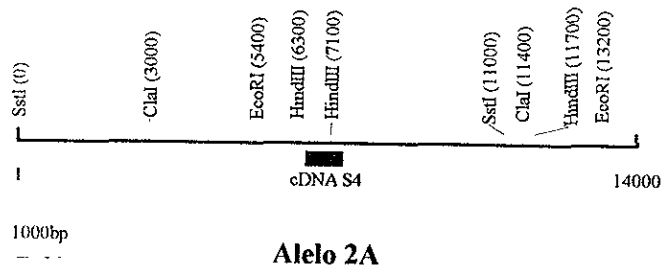
Se ha reportado la existencia de dos genes que codifican para homólogos de la proteína S4, los cuales ya se han aislado y secuenciado. En humanos existen dos isoformas para la proteína ribosomal S4, RPS4X y RPS4Y (Fisher et al, 1990), y en levaduras el homólogo para la proteína S4, denominada S7, presenta dos copias génicas RPS7A y RPS7B (Synetos, Dabeva y Warner, 1992). En nuestro laboratorio se ha aislado y secuenciado una clona de DNAC completa (incluye región codificadora) para la proteína ribosomal S4 en T.cruzi. Este gen se utilizó como sonda radioactiva para hibridar el Southern blot y Northern blot. En el Southern blot de DNA genómico digerido con *BamHI* y *PstI* (carril 4 y 5 respectivamente, fig.1B), se observan dos fragmentos génicos para cada una de estas enzimas, y dado que no tienen sitio de corte interno en la DNAC para la proteína S4, es posible que existan de dos formas génicas para la proteína S4. Las bandas de hibridación con un solo fragmento, como es el caso de las digestiones enzimáticas con *EcoRI* y *ClaI* (carril 2 y 3 respectivamente fig.1B), sugiere la presencia dos fragmentos génicos no separados. En la figura 2, cuyo gel se dejó correr más tiempo, ahora encontramos dos bandas con tamaños diferentes al cortar el DNA genómico con *EcoRI* (carril 1), que al sumarlos y obtener el tamaño promedio corresponden al único fragmento génico con *EcoRI* en la fig.1B. Las enzimas de restricción mencionadas no tienen sitio de corte en la secuencia nucleotídica de DNAC para la proteína ribosomal S4, sin embargo, esta secuencia contiene un solo sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *HindIII* (posición 792 pb) (Hernández R.,1998). Es de esperarse ver por lo menos tres bandas de hibridación al digerir el DNA total con *HindIII* (carril 3, fig 1B). Dos de estas bandas de hibridación con mayor tamaño corresponden a los fragmentos génicos para cada uno de los dos alelos, y el tercer fragmento génico de menor tamaño, es común para ambos alelos.

Conjuntamente se realizaron digestiones dobles con enzimas de restricción *EcoRI-SstI*, *EcoRI-ClaI* y *SstI-ClaI*. Los tamaños de los fragmentos en las digestiones enzimáticas dobles, mencionados en la sección de resultados, se

utilizaron para determinar la localización de un sitio de corte enzimático con respecto a otros sitios de corte alrededor, que estructuralmente forma parte de un mapa de restricción. Primeramente se inició por determinar la localización del sitio de corte para *HindIII* en un posible mapa de restricción genómico, cuya posición se conoce a partir del DNAC de la proteína ribosomal S4. En base a los sitios de restricción para *HindIII*, se fueron incorporando los demás sitios de corte para las diferentes enzimas de restricción utilizadas. En la figura 7 y 8 se presentan dos posibles arreglos génicos de los fragmentos de digestión analizados para cada enzima de restricción, y para cada alelo de la proteína ribosomal S4



**FIGURA 7.** Dos posibles arreglos genicos de los fragmentos de DNA digeridos, para el alelo 1 de la proteína ribosomal S4.



**FIGURA 8.** Dos posibles arreglos genicos de los fragmentos de restricción, para el alelo 2 de la proteína ribosomal

## **5.2. Localización cromosomal para la proteína S4.**

La localización cromosomal, de secuencias altamente o medianamente repetidas de DNA, RNA y genes codificantes de proteínas; se ha determinado por hibridación de Southern blot de cromosomas con sondas homólogas (Cano, M.I. et al, 1995). Como parte de nuestro trabajo en la determinación de la localización cromosomal para la proteína ribosomal S4, se separaron los cromosomas de *T.cruzi* (cepa CL Brener) en un gel de electroforesis de campos alternos, el cual se utilizó para el Southern blot, y se hibridó con la sonda de DNAc de la proteína S4.

Estudios experimentales del perfil cromosomal de la familia de genes para la proteína ribosomal ácida P2 en *T.cruzi*, se han observado seis bandas cromosomales. Dos de estas bandas (2.3 y 2.6 Mbp) migran cercanamente, describiéndose como posibles cromosomas homólogos (Zingales B., Rodinelli E., De grave W., et al., 1997). En la figura 3B se observan dos bandas cromosomales de 800 y 900 kpb, que sugieren ser dos formas alélicas para la proteína S4, así mismo, es posible que los dos alelos forman parte de cromosomas homólogos ya que difieren ligeramente en su tamaño. La determinación cromosomal de dos alelos para la proteína ribosomal S4, correlaciona con el análisis de los resultados en el Southern blot genómico digerido con enzimas de restricción.

## **5.3. Análisis de la expresión genica para la proteína ribosomal S4 y nucleolina.**

Del análisis del Northern blot de RNA total, se deduce que el tamaño del transcrito para la proteína ribosomal S4 es aproximadamente de 1 kb (tamaño del DNAc 953 pb) (fig 5A). En células eucarióticas y procarióticas, la biogénesis ribosomal esta directamente regulado por el crecimiento celular, por ejemplo en eucariontes la producción del ribosoma puede reducirse o detenerse en la fase estacionaria (Becker et al. 1971, Tshinski and Warner 1982). Con el interés de conocer si existe una relación dependiente de la proliferación celular (donde se espera una biogénesis ribosomal diferente) con la expresión génica de la proteína ribosomal S4 aquí estudiada, se comparó los niveles de expresión del transcrito

para la proteína S4 apartir del RNA total aislado de epimastigotes en fase exponencial y en fase estacionaria, fig.5 Se observa que las concentraciones de equilibrio del RNA para la proteína S4 en ambas fases de crecimiento son similares, posiblemente por que el proceso transcripcional no varía con respecto a la estabilidad de las especies RNAm. La expresión de la mayoría de las proteínas ribosomales en eucariontes esta regulada posttraduccionalmente. Nuestros resultados no excluyen que bajo condiciones fisiológicas diferentes exista regulación traduccional o posttraduccional de la proteína ribosomal S4.

Conjuntamente se realizó el análisis de Northern blot para nucleolina (Fig. 6) Se observaron no menos de tres transcritos, sugiriéndonos la presencia de una familia génica para esta proteína nucleolar en *T. cruzi*. La nucleolina participa directamente en la biogénesis del ribosoma, además de que los niveles de nucleolina se correlacionan con la síntesis de RNAr. Por lo anterior y por ser una proteína no estructural del ribosoma, se utilizó como marcador indirecto de la biogénesis ribosomal. El perfil de expresión de la nucleolina durante la fase logarítmica y fase estacionaria se mantiene en concentraciones de equilibrio. Los análisis de expresión para nucleolina son similares con los resultados de expresión para la proteína S4, lo cual sugiere que de existir regulación en la expresión de ambos genes, esto ocurre en niveles distintos a lo que puede verse con la técnica de Northern blot (nivel de equilibrio entre síntesis y degradación de un RNA particular).

### **Perspectivas.**

El presente trabajo sugiere la existencia de dos alelos para la proteína ribosomal S4. Sin embargo la búsqueda en una biblioteca genómica de *T. cruzi*, utilizando el DNAc de la proteína S4 como sonda, permitiría obtener clonas genómicas para esta proteína, que posteriormente al secuenciarlas aportaría más información acerca de su organización genómica.

Con la obtención de clonas genómicas en *T.cruzi* se podrían realizar estudios de Knock outs, donde se lleva acabo la anulación alélica mediante deleción, permitiéndonos inferir mediante fenotipos atipicos las funciones de los genes para la proteína ribosomal S4.

## *CAPITULO VI*

# *CONCLUSIONES*



Los resultados del análisis de restricción e hibridación sugieren que existen dos genes para la proteína ribosomal S4 en *T.cruzi*. Además se utilizaron los fragmentos de DNA obtenidos de las digestiones dobles enzimáticas para proponer dos posibles arreglos genicos para cada gen de la proteína S4.

Cromosomas de *T.cruzi* fueron separados por electroforesis de campos alternos transversos, y mediante ensayos tipo "Southern" se encontraron dos cromosomas (800 y 900 kpb), los cuales posiblemente forman parte de dos cromosomas homólogos.

Ensayos preliminares tipo Northern indica que el transcrito para la proteína S4 es aproximadamente 1 kb. Así mismo las concentraciones de equilibrio del RNA en diferentes fases de proliferación celular no son diferentes lo que no excluye que bajo condiciones de crecimiento diferentes existe regulación traduccional y posttraduccional

Mediante ensayos de Northern blot en nucleolina, se estima que al menos se expresan cuatro clases de transcritos con diferentes tamaños, los cuales sugieren la presencia de una familia génica para esta proteína nucleolar en *T.cruzi*. La concentración en equilibrio del RNA en epimastigote en fase logarítmica y estacionaria son similares.

## VI Apéndice.

### LIT

NaCl	4.0 g/l
KCl	6.4 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.0 g/l
Glucosa	2.0 g/l
Triptosa	5.0 g/l
Caldo de infusión de hígado	5.0 g/l
Hemina	25 mg
Suero fetal bovino	10%
Solución penicilina estreptomicina 100X	10 ml

El pH se ajustó con HCl a 7.2

### NZCYM

Hidrolizado enzimático de caseína	10 g/l
NaCl	5.0 g/l
Extracto de levadura	5.0 g/l
Casaminoácidos	1.0 g/l
MgSO <sub>4</sub>	2.0 g/l

### Medio Luria.

NaCl	10 g/l
Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5.0 g/l
Tris 1 M pH8.0	10 ml

Medio sólido 1.5% agar.

## *CAPITULO VII*

# *BIBLIOGRAFÍA*

- ☐ Abovich, N., Gritz, L., Tung, L., and Rosbash, M 1985. Effect of RP51 gene dosage alterations on ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mol. Cell Biol 5:3429-3435.
- ☐ Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1994. Molecular Biology of the Cell. 3ed. Garland Publishing. New York.
- ☐ Amaldi, F., Camacho-Vanegas, O., Candinali, B., Cecconi, F., Crosio, C, Loreni, F., Mariottini, P., Pellizzoni, L., and Pierandrei-Amaldi, P. 1995 Structure and expression of ribosomal protein genes in *Xenopus laevis*. Biochem. Cell Biol. 73:969-977
- ☐ Ballal, N R., Kang, Y -L., Olson, MOJ and Bush, H. 1975. Changes in nucleolar proteins and their phosphorylation patterns during liver regeneration. J.Biol.Chem. 10: 5921-5925
- ☐ Benne, R., Van der Brug, J., Sloof, P., Van Boom, J., Tromp, M 1986. Major transcript of the frameshifted cox II gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. Cell 46:819-826.
- ☐ Braun, H., Emmerman, M, Mentzel, H, Klaus Schmitz, U. 1994 Primary structure and expression of a gene encoding the cytosolic ribosomal protein S4 from potato. Biochem Biophys. Acta. 1218: 435-438
- ☐ Bouche, G., Gas, N., Prats, H., Baldin, V , Tauber, J.-P , Teissie, J. and Amalric, F. 1987. Basic Fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0-G1 transition. Proc. Natl Acad Sci. USA 84:6770-6774.
- ☐ Castro, C , Graig, S.P and Castañeda, M. 1981. Genome organization and ploidy number in *T.cruzi* Mol Biochem. Parasitol. 4: 273-282.

- ☞ Dabeva, M.D., Post-Beittenmiller, M.A., and Warner, J.R. 1986. Autogenous regulation of splicing of transcript of a yeast ribosomal protein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5854-5857.
- ☞ De Luca D'Oro, Cardenal, C., Perret, B., Crisci, J., Montamat, E. 1993 Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. *Parasitology.* 107. 405-410.
- ☞ Donovan, D.M., and Pearson, N.J. 1986. Transcriptional regulation of ribosomal proteins during a nutritional upshift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 6. 2429-2435.
- ☞ Dubov, K.P., and Perry, R.P. 1984. The gene family encoding the mouse ribosomal protein L32 contains a uniquely expressed intron containing gene and unmutated processed. *Cell.* 37: 457-468.
- ☞ Fisher, E., Beer-Romero, P., Brown, L., Ridley, A., McNeil, J., Lawrence, J., Willard, H., Bieber, F., Page, D. 1990. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell.* 63:1205-1218.
- ☞ Gayathri, D.K., Yuen-Ling, C., Wool, I 1989. The primary structure of rat-ribosomal protein S4. *Biochim Biophys. Acta.* 1008: 258-262.
- ☞ Hamil, K.G., Nam, H.G., and Fried, H.M. 1988. Constitutive transcription of yeast ribosomal protein gene TCM1 is promoted by uncommon cis- and trans-actin elements. *Mol Cell Biol.* 8: 4328-4341.

- ☞ Hayes, R.J., and Schofield, G.J. 1990. Estimación de las tasas de incidencia de infecciones crónicas a partir de la prevalencia: la enfermedad de Chagas en América Latina. *Boletín de la oficina Sanitaria Panamericana*. 108: 308-316.
- ☞ Henriksson, J., Aslund, L., Macina, R., Franked de Cazzulo, B., Cazzulo, J., Frasch, A and Petterson, U 1990. Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *T.cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 42: 213-224.
- ☞ Hernández, R., Diaz de León, F., and Castañeda, M. 1988. Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol and Biochem. Parasitol.* 27: 275-280
- ☞ Hernández-Rivas, R., Martínez, C.S., Romero, M. y Hernández R. 1992. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes. molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiology Letters*. 92: 63-68.
- ☞ Hernández, R., Martínez, S.C., Hernández-Rivas, R., y Gómez E. 1993. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol. Res* 26. 109-114.
- ☞ Hernández, R., Palacios, S., Herrera, J., Martínez, S., López, I. 1998. The deduced primary structure of a ribosomal protein S4 from *T.cruzi*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 321-325
- ☞ Herruer, M.H., Mager, W.H., Woudt, L.P., Nieuwint, R T.M., Wassenaar, G.M., Groeneveld, P., and Planta 1988. Mild temperature shock affects transcription of yeast ribosomal protein genes as well as the stability of their mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 16: 7917-7929.

- 📖 Kim, C.H., and Warner, J R 1983. Mild temperature shock alters the transcription (initiation factor and is DNA sequence-independent) of a discrete class of *Saccharomyces cerevisiae* genes. *Mol. Cell Biol* 3: 457-465
  
- 📖 Larson, D., Zahradka, P., and Sells, B. 1991 Control points in eucaryotic ribosome biogenesis - a review. *Biochem. Cell Biol.* 69: 5-22.
  
- 📖 Lee, M.G.S., Van der Ploeg, L.H.T 1997. Transcription of protein coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. *Annv. Rev. Microbial.* 51: 463-489.
  
- 📖 Leer, R.J, Van Raamsdonk-Duin, M.M.C, Molengar, C.M.T., Witsenboer, H.M.A., Mager, W.H, and Planta, R.J.1985. Yeast contains two functional genes coding for ribosomal protein S10. *Nucleic Acids Res.* 13: 5027-5039.
  
- 📖 Levin, M.J., Vazquez, D.K., and Schijman A.G. 1993. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: classification and antigenicity. *Parasitology Today.* 9(10): 381-384
  
- 📖 Luquetti, A., Miles, M., Rassi, A, De Rezende, J., De Souza A., Povca M., and Rodriguez I. 1986. *T.cruzi*. zymodemes associated with acute and chronic Chagas disease in central Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80. 462-470.
  
- 📖 Mazzotti, L 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gac. Med. Mex.* 70: 417-420.
  
- 📖 Montamat, E, De Luca D'Oro, G., Gallerano, R, Sosa, R., and Blanco, A. 1996 Charactiration of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture *AmJ Trop. Med. Hyg.* 55(6) 625-628.

- ☐ Mundus, D., Bulgyn, K., Yam Kovoy, V., Malygin, A , Repkova, M , Vraskikh, L , Venjaminova, A , Vladimirov, S., Karpova G 1993. Structural arregament of the codon-anticodon interaction area in human placenta ribosomes. Affinity labelling of the 40S subunits by derivatives of oligoribonucleotidos containing the AUG codon. *Biochim Biophys. Acta* 1173: 273-282.
  
- ☐ Murray, N., Schnare, and Gray, M.W. 1990. Sixteen discrete RNA component sinthe Cytoplasmic Ribosome of *Euglena gracilis*. *J Mol. Biol.* 215 73-83.
  
- ☐ Orrick, L.R., Olson, M.O.J., and Bush, H., 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis *Proc.Nalt.Acad.Sci. U.S A* 70: 1316-1320.
  
- ☐ Pierandrei-Amandi, P., Beccari, E., Bozzoni, I., and Amaldi, F. 1985 Ribosomal protein production in normal and anuclealate *Xenopus* embryos: regulation at the post-transcriptional and transcriptional leves. *Cell*, 42: 317-323
  
- ☐ Pinto, J , Marreto, M., and Andrade, S 1994 *Revista da Socieda de Brasileira da Medicine Tropical.* 27(4). 209-215.
  
- ☐ Rau, H.A , and planta, R.J. 1991. Ribosome biogenesis in yeast *Progress in Nucleic Acid Research and Mol. Biol* 41: 89-129.
  
- ☐ Reyes, P. 1984. *Enfermedad de Chagas en México.* *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 54:1-2.
  
- ☐ Sanchez Hernández Beatriz. *Uso de Elisa, Western Blot y Hemocultivo para el estudio de la enfermedad de Chagas en el estado de Morelos.* Tesis Universidad Autonoma Benito Juarez de Oaxaca 1996. 9-21



- ☞ Schare, M.N., Cook, J., and Gray, M. 1990. Fourteen International transcribed spacers in the circular ribosomal DNA of *Euglena gracilis*. *J. Mol. Biol.* 215: 85-91.
- ☞ Schimmin, L.C., Ramírez, C., Matheson, A.T., and Dennis, P.P. 1989. Sequence alignment and evolutionary comparison of the L10 equivalent and L12 equivalent ribosomal proteins from Archaeobacteria, eubacteria, and eucaryotes. *J.mol. Evol* 29: 448-462.
- ☞ Schofield, C.J., and Dujardin J. 1997. Chagas disease vector control in Central America. *Parasitology Today.* 13(4). 141-144
- ☞ Shi, Y., and Tyler, B.M. 1991. Coordinate expression of ribosomal protein genes in *Neurospora crassa* and identification of conserved upstream sequence. *Nucleic Acids Res.* 19(23): 6511-6517.
- ☞ Skeiky, Y.A.W., Benson, D.R., Guderian, J.A., Sleath, P.R., Parsons, M., and Reed, S.G. 1993. Trypanosoma cruzi acidic ribosomal P protein gene family. *J. Inn.* 151(10): 5504-5515.
- ☞ Soto, M., Requena, J.M., García, M., Gomez, L.C., Navarrete, I., and Alonso, C. 1993. Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. *The Journal of Biological Chemistry.* 268(29): 21835-21843.
- ☞ Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol.Biol.* 98:503-517.
- ☞ Stevens, A.R., and Pachler, P.F. 1972. Discontinuity of 26s rRNA in *Acanthamoeba castellanii*. *J.Mol. Biol.* 66:225-237.

- ☞ Storino,R. y Milei, J 1994 “Enfermedad de Chagas”. Doyma Argentina 2. 649pp.
- ☞ Stuart, K., Feagin, J., Abraham, J 1989. RNA editing the creation of nucleotide sequences in mRNA- a minireview *Gene* 82:155-160
- ☞ Synetos, D., Dabeva, M , Warner, J. 1992. The yeast ribosomal protein S7 and its genes *J Biol Chem.* 267: 3008-3013
- ☞ Teem, J L., and Rosbash, M 1983. Expression of beta-galactosidase gene containing the ribosomal protein 51 intron in sensitive to the *rna2* mutation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4403-4407
- ☞ Zingales, B , Rondinelli, E., Degrave, W., Silveira, J. F., Levin, M., Le Pastier, D. 1997. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. *Parasitology Today* 13(1): 16-22
- ☞ Tschudi, C , Young, A., Ruben, L., Patton, C., and Richards, F 1985. Calmodulin genes in trypanosomes are tandemly repeated and produce multiple mRNAs with a common 5' leader sequence *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3998-4002.
- ☞ Uchimi, T., Kikuchi, M., Ogato, K. 1986. Cross-linking study on protein neighborhoods at the subunit interface of rat liver ribosomes with 2-iminothiolane. *J. Biol Chem.* 261. 9663-9667.
- ☞ Vanhamme, L., Pays, E., 1995. Control of gene expression in Trypanosomes. *Mic Rev.* 59:223-240.
- ☞ Velasco, O. 1992 La enfermedad de Chagas en México. *Infectología* (12): 783-791

- 📖 Velasco, O., Valdespino, J.L., Tapia C.R., Salvatierra, B., Magos, C., Llausas, A., Gutierrez, G., Sepulveda, J. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Sal. Pub. Mex.* 34: 186-196
- 📖 Velasco, O., Guzmán, C., Ibañez, S. 1994. Enfermedades Tropicales en México. diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. *INDRE* 281-292.
- 📖 Vignais, M.L., Woudt, L.P., Wassenaar, G.M., Mager, W.H., Sentenac, A., and Planta, R.J. 1987. Specific bind of TUF factor to upstream activation sites of yeast ribosomal protein genes. *EMBO J.* 6: 1451-1457.
- 📖 Weisenberger, D., and Scheer, U. 1995. A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *J. Cell Biol.* 129(3): 561-575.
- 📖 Wool, I., Chang, Y.L., Gluck, A. 1995. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem. Cell Biol.* 73: 933-947.