



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Título:**

**Caracterización molecular de los genes de  
fibrilarina en *Trypanosoma cruzi***

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**ERNESTO GUERRERO SÁNCHEZ**



**MÉXICO, D. F.**

**AÑO 2010**



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: CARMEN GIRAL BARNÉS**

**VOCAL: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS**

**SECRETARIO: ROBERTO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ**

**1er. SUPLENTE: MARIA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ**

**2° SUPLENTE: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Roberto Hernández Fernández**

**SUSTENTANTE:**

**Ernesto Guerrero Sánchez**

*Dedico este proyecto y mis años de vida académica  
a quienes han estado a mi lado brindando amor, apoyo,  
confianza y el temple necesario para continuar luchando día tras día  
rompiendo las barreras que se me presenten.*

*A mí familia y amigos.*

## Agradecimientos

Reitero el eterno agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, *Alma matter* por consagrarme académicamente, además de vincularme al fascinante entorno científico que ha llenado mi vida.

A la Facultad de Química, por darme los conocimientos necesarios para poder desarrollarme como Químico-Farmacéutico Biológico.

A los miembros del jurado que amablemente contribuyeron en la revisión de mi tesis.

Al Dr. Roberto Hernández Fernández que me brindó la oportunidad de desarrollar el presente proyecto en su laboratorio, que además de haber fungido como mi tutor, ha sido un guía enfocado siempre a la superación personal, intelectual y científica.

A mis compañeros del laboratorio: Israel Cañas, Tomás Nepomuceno, Dennis Martínez, Felipe Osorio, Esteban López, Karelía Rangel, de forma especial a Juliana Herrera por toda la ayuda y amistad incondicional, además le agradezco a la Dra. Ana María Cevallos, la Dra. Imelda López y su grupo de trabajo por sus consejos que enriquecieron la interpretación de resultados y discusión de mi tesis durante los seminarios de grupo.

A Evelyn Fein que más allá de ser una compañera en el laboratorio y proyecto, fue una gran amiga que dejó en mí consejos, momentos felices y buenos recuerdos. Todos somos arrieros, en el camino andamos y algún día nos tenemos que encontrar.

A mis padres, Esperanza y Ernesto, mis hermanos Erika y Enrique, a mis abuelos (Ernesto, Rosario y Catalina), tíos (En especial a Alberto, Laura, Joaquín y Silvia), primos (En especial a Ulises, Gabriel, Daniel, Mario y Anabel), a todos los quiero y gracias por siempre estar conmigo.

A Itzel Delgado que se ha vuelto la luz de mi vida, mi mejor amiga, mi bastón, mi consejera y una gran compañera.

A mis hermanos de vida: Andrés Askur, Shack, Lalitro e Itzel. A Mis "compas" amigos, cuates, brothers, etc: Tere, Brensss, Maggie, Alesita, Mitzi, Ara, Desi, Chabela, Flor, Kike Wevas, Chip, Mau Frodo, Mac, Waikiki Beach Boy Alex, JerrysJuan, La perrita, Emilionjas, Dennis, Juan, Paco, Pelos, Patas, Haza, Roger, Javo, Ivan, Estorbo, Tony, Rock-e, Hector, Castor, La comadre y Osic. Disculpen si faltó alguien, saben que a todos los adoro mis carnales. A los viernes en la Fac, noches de Cubil y a todos los presentes en tan distinguidas reuniones, salud!

# Índice.

<b>Abreviaturas</b>	7
<b>Lista de Figuras y Tablas</b>	9
<b>Resumen</b>	10
<b>1. Introducción</b>	11
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.1.1. Clasificación Taxonómica	11
1.1.2. Estructura del grupo biológico	11
1.1.3. Diversidad genética y linajes de <i>T. cruzi</i>	12
1.1.4. Organización genómica	14
1.1.5. Ciclo de vida	15
1.2. Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas)	19
1.2.1. Fases de enfermedad de Chagas	19
1.2.2. Diagnóstico y tratamiento	21
1.3. <i>T. cruzi</i> como modelo biológico	22
1.4. Características de los ribosomas	23
1.4.1. Biogénesis de los ribosomas	24
1.4.2. Maduración de ARNr	26
1.4.2.1. Pequeños ARN nucleolares (snoRNAs)	27
1.4.2.2. Ribonucleoproteínas pequeñas (snoRNP)	29
1.4. Fibrilarina	30
1.4.1 La fibrilarina, snoRNP C/D metiltransferasa	31
1.4.2 Fibrilarina en <i>T. cruzi</i>	32
<b>2. Hipótesis</b>	35
<b>3. Objetivo General</b>	36
3.1. Objetivos Específicos	36
<b>4. Material y métodos</b>	37
4.1. Cultivos	37
4.2. Extracciones de material genético	38
4.2.1. Extracción de DNA genómico	38
4.2.2. Extracción de ARN total con Trizol	38
4.3. Obtención de sondas específicas para los genes de fibrilarina	39
4.3.1. Amplificación por PCR de fragmentos de los genes de fibrilarina	39
4.3.2. Extracción de los productos amplificados por PCR	41
4.3.3. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> por SEM (Simple and Efficient Method)	42

4.3.4.	Clonación de productos amplificados en pGEM easy Vector y transformación de bacterias competentes	42
4.3.5.	Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (Minipreps)	42
4.3.6.	Digestiones enzimáticas en construcciones plasmídicas	44
4.3.7.	Extracción de DNA plasmídico a mediana escala (Midipreps)	45
4.3.8.	Construcciones plasmídicas	45
4.3.9.	Preparación de sondas con marca radioactiva	46
4.4	Caracterización de fibrilarina en <i>T. cruzi</i> por ensayos de <i>Southern blot</i> y <i>northern blot</i> de los genes de fibrilarina	47
4.4.1.	Experimentos tipo <i>Southern blot</i>	47
4.4.2.	Experimentos tipo <i>northern blot</i>	48
4.4.3.	Control de carga y niveles ARNm de fibrilarina	49
4.5.	Herramientas bioinformáticas	49
4.5.1.	Alineamientos, Patrón de restricción y Blast	49
4.5.1	Modelaje molecular	50
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	51
5.1.	Obtención de sondas específicas de los genes de fibrilarina	51
5.2.	Ensayos de hibridación cruzada para las sondas gene-específicas	56
5.2.1.	Ensayo de hibridación cruzada entre sondas: Tc50Fibr y Tc150Fibr, y plásmidos: pGEM-Tc50Fibr y pGEM-Tc150Fibr	56
5.2.2.	Ensayo de hibridación gene-específica con las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr	57
5.3.	Ensayo de hibridación con los transcritos de fibrilarina utilizados las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr durante el crecimiento de <i>T. cruzi</i>	60
5.4.	Ensayo de hibridación con los transcritos de fibrilarina utilizado las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr en poblaciones diferenciadas de <i>T. cruzi</i>	64
<b>6.</b>	<b>Discusión</b>	67
<b>7.</b>	<b>Conclusiones</b>	78
<b>8.</b>	<b>Perspectivas</b>	79
	<b>Referencias</b>	80
	<b>Anexo: Soluciones y medios de cultivo</b>	88
	<b>Anexo I</b>	90
	<b>Anexo II</b>	92
	<b>Anexo III</b>	95
	<b>Anexo IV</b>	97

## Abreviaturas.

°C	Grados Celsius
aa	aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosomal
AdoMet	S-adenosylmethionina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	RNA mensajero
ARNr	RNA ribosomal
ARN pol I	RNA polimerasa I
ARN pol II	RNA polimerasa II
ARN pol III	RNA polimerasa III
cap	Guanosina del extremo 5' metilada en el carbono 7
CG	Compartimiento granular
cm	Centímetros
D.O. <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm
DEPC	Dietil-piro-carbonato
DFC	Componente Fibrilar Denso
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTU	Unidad Discreta de Tipificación
EDTA	Dietiletanolamina
FC	Centros fibrilares
Fib	Gen de fibrilarina
F Est	Fase estacionaria
Fig.	Figura
F Log	Fase logarítmica
GAR	Region rica en glicina y arginina
h	Hora(s)
H <sub>2</sub> O	Agua
ID	Clave de acceso en la base de datos del proyecto genoma
ITS	Espaciador interno transcrito
DNA-K	DNA del cinetoplasto
kb	Kilo base(s)
kDa	Kilo Dalton
LB	Medio de cultivo Luria-Broth
LIT	Medio de cultivo de infusión de hígado y triptona
M	Molar
Meta	Tripomastigotes metacíclicos



μg	Microgramos
min	Minuto
μl	Microlitros
ml	Mililitro
μM	Micromolar
ng	Nanogramos
nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Poli(Y)	Región rica en pirimidinas
Pre-ARNr	Precursor de ARN ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
SL	Spliced Leader o miniexón
snoRNA	Pequeños ARN nucleolares
snoRNP	Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas
TA	Temperatura ambiente
TE	Amortiguador Tris-EDTA
Tm	Temperatura de anillaje
UTR	Región no traducida
V	Volts

## Lista de Figuras y Tablas.

### Figuras.

Fig. 1	Esquema de la evolución de los grupos de <i>T. cruzi</i>	13
Fig. 2	<i>Trans-splicing</i> y poliadenilación.	15
Fig. 3	Representación esquemática de los principales estadios de <i>T. cruzi</i>	17
Fig. 4	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	18
Fig. 5	Modelo de la biogénesis de los ribosomas	24
Fig. 6	Diagrama del cistrón de ARN ribosomal de <i>T. cruzi</i>	26
Fig. 7	Estructura secundaria de los snoRNAs y sus reglas de orientación	28
Fig. 8	Modificaciones post-transcripcionales más abundantes en los ARN Ribosomales	30
Fig. 9	Fibrilarina, snoRNP C/D metiltransferasa	32
Fig. 10	Secuencias de los genes Fib 50 y Fib 250 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
Fig. 11	Productos de la reacción de PCR	53
Fig. 12	Plásmidos pGEM-Tc50Fibr y pGEM-Tc150Fibr	55
Fig. 13	Ensayo de hibridación cruzada entre las sondas de fibrilarina y 56 los plásmidos pGEM-Tc50Fibr y pGEM-Tc150Fibr.	56
Fig. 14	Mapa de sitios de restricción	59
Fig. 15	Hibridación gene específica de los alelos de fibrilarina con las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr	60
Fig. 16	Porcentaje de ARNm de fibrilarina durante el crecimiento de epimastigotes	63
Fig.17	Porcentaje de ARNm de fibrilarina en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos	66
Fig. 18	Estructura primaria de las 2 isoformas de fibrilarina	69
Fig. 19	Modelaje molecular de las 2 isoformas de fibrilarina	70
Fig. 20	Nivel de expresión de transcritos de fibrilarina en diferentes etapas del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	77

### Tablas.

Tabla 1	Características generales de los alelos de fibrilarina en <i>T. cruzi</i> (CL Brener)	34
Tabla 2	Características de los oligonucleótidos usados en la reacción de PCR	41
Tabla 3	Características de las construcciones plasmídicas con fragmentos de los genes de fibrilarina	46
Tabla 4	Porcentaje de similitud en secuencia en los alelos de fibrilarina	52
Tabla 5	Cantidad de parásitos por mililitro en diferentes días de incubación y concentración de ARN total extraído	61
Tabla 6	Cantidad de parásitos por mililitro y concentración de ARN total extraído de parásitos diferenciados	64

## Resumen.

*Trypanosoma cruzi* es un protozoario digenético, hemoflagelado causante de la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). Este parásito alterna durante su ciclo de vida entre estadios proliferativos (epimastigote y amastigote) y estadios diferenciados donde la célula no se divide (tripomastigotes). Las evidencias estructurales indican que el nucleolo es evidente solo en las formas celulares que se dividen (como lo es el epimastigote). La fibrilarina (~34 kDa) es una proteína nucleolar altamente conservada entre las especies, que presenta un papel fundamental en la maduración del ARNr precursor (pre-ARN), como lo es la metilación de bases específicas. Estos sitios de metilación son guiados por el reconocimiento de un ARN de doble cadena integrado por el pre-ARNr y pequeños ARN nucleolares de tipo C/D. Interesados en la biología fundamental de *T. cruzi*, particularmente en la biogénesis de ribosomas y en la estructuración del nucleolo, en el presente trabajo se inicia el estudio molecular del sistema génico de fibrilarina. A partir de ADN genómico se amplificó una sonda homóloga de regiones internas para cada par de alelos anotados de fibrilarina. Con análisis bioinformático se caracterizaron los contigs que contenían los genes de fibrilarina y por ensayos de hibridación utilizando ADN genómico digerido (*Southern blot* genómico) se verificó la especificidad de las sondas. Los transcritos de fibrilarina fueron identificados y caracterizados con las sondas gene-específicas en ensayo *northern blot*. Los ARNm identificados tienen un tamaño aproximado de 2.1 kb, tamaño suficiente para contener la región codificadora de las 2 isoformas de fibrilarina. Con el seguimiento de la curva de crecimiento de epimastigotes se observó que fases estacionarias de epimastigote la cantidad de transcritos de fibrilarina disminuye, sin embargo esta disminución se hace más evidente en formas metacíclicas. La conclusión del trabajo resalta la probable regulación en la expresión de fibrilarina en *T. cruzi* en diferentes condiciones de proliferación celular.

# 1. Introducción.

## 1.1. *Trypanosoma cruzi*

Es un parásito protozoario digénético que alterna, en su ciclo de vida natural, entre un huésped vertebrado y otro invertebrado.

### 1.1.1. Clasificación taxonómica:

Reino: *Protista*

Subreino: *Protozoa*

Phylum: *Sarcomastigophora*

Clase: *Zoomastigophora*

Orden: *Kinetoplastidae*

Familia: *Trypanozomatidae*

Género: *Trypanosoma*

Subgénero: *Schizotrypanum*

Especie: *cruzi*

### 1.1.2. Estructura del grupo biológico

Los tripanosomas de los mamíferos han sido divididos en dos secciones:

Salivaria y Estercorlaria, a esta última pertenece *Trypanosoma cruzi*, la característica de esta sección es que estos parásitos son transmitidos por un insecto vector a partir de las deyecciones que elimina.

A continuación se describen algunas estructuras subcelulares de este grupo biológico:

*T. cruzi* posee una estructura llamada cinetoplasto (característica del Orden *Kinetoplastidae*) integrada a una mitocondria que recorre todo su cuerpo. En una región especializada de esta se ubica el ADN-K (Stornio y Milei, 1994; McGeeh y

Cosgrove, 1980). El ADN-K es la porción más grande de material genético extranuclear hasta ahora descrito. Puede representar hasta el 20% del total del ADN celular y está estructurado como una malla de círculos concatenados.

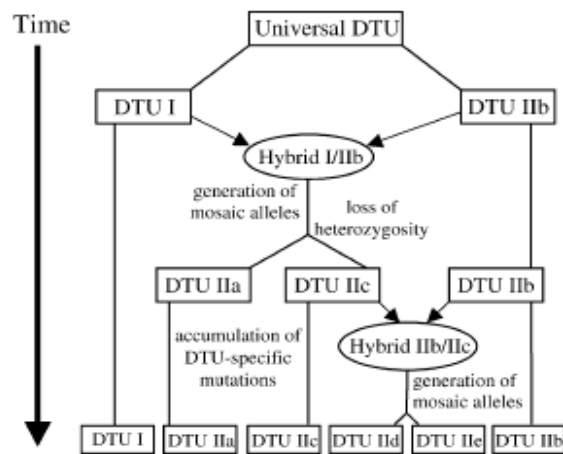
El único flagelo que el parásito posee nace del cuerpo basal o cinetosoma que está situado cerca de la envoltura mitocondrial de cinetoplasto, y surge por el bolsillo flagelar (característica de la Familia *Trypanosomatidae*). El cinetosoma tiene una estructura cilíndrica constituida por 9 tripletes de microtúbulos que se proyectan hacia el bolsillo flagelar: una parte es citoplasmática y la otra es una zona de transición hacia el flagelo; entre ambas existe un septum. El flagelo presenta 9 pares de microtúbulos periféricos longitudinales, unidos entre sí por filamentos oblicuos, que conforman una banda estriada de aproximadamente 10.15  $\mu\text{m}$  de diámetro. El flagelo presenta una vaina que es una extensión tubular de la membrana celular. El conjunto de flagelo más cinetosoma constituye el órgano de locomoción del parásito (Fig. 3B; Storino y Milei, 1994).

El aparato de Golgi está cerca del bolsillo flagelar sin conectarse con el cuerpo basal ni con el flagelo. El núcleo del parásito es fibrilar y cuando comienza a duplicarse se presenta en acúmulos de material genético próximos a la membrana nuclear. El cuerpo del parásito está limitado por la membrana citoplasmática que tiene 8-10 nm de espesor y por debajo de ella se encuentra el sistema de microtúbulos (Fig. 3B; Storino y Milei, 1994).

### **1.1.3. Diversidad genética y linajes de *T. cruzi*:**

*T. cruzi* está clasificado como una sola especie que muestra una gran diversidad genética y fenotípica. La clasificación actual reconoce dos tipos genéticos o subespecies, *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. El grupo *T. cruzi* I se encuentra ligado al ciclo de transmisión selvático e infección de marsupiales, y a *T. cruzi* II se asocia al ciclo de transmisión doméstica e infección a mamíferos, este linaje se dividió en: IIa, IIb, IIc, IId y IIe. La clasificación del II reconoce 5 subgrupos o linajes (DTU, Unidad Discreta de Tipificación) IIa, IIb, IIc, IId y IIe, siendo DTU I

correspondiente al linaje *T. cruzi* I y el DTU IIb correspondiente al linaje *T. cruzi* II. Los sublinajes IIa, IIc-e incluyen las cepas híbridas originadas a partir de eventos de hibridación entre DTU I y DTU IIb (Fig. 1). La cepa usada en el proyecto del genoma (CL Brener) esta clasificada como miembro del linaje IIe, y ancestralmente se considera que es un híbrido derivado del linaje IIb y del linaje IIc. Debido a esto, durante el análisis del genoma se encontraron una gran taza variaciones alélicas. Recientemente se dio a conocer la localización cromosómica de la mayoría de los genes de *T. cruzi* (CL Brener), anotados en el proyecto genoma (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) en el que se cuentan 41 cromosomas (Aslett et al, 2010; Weatherly et al 2009; Westenberger et al, 2005).



**Fig. 1 Esquema de la evolución de los grupos *T. cruzi*.** Las cajas representan los grupos existentes y sus progenitores ancestrales. Las líneas que conectan las cajas representan los periodos de la reproducción clonal. Las flechas representan las contribuciones de varios DTUs para formar las nuevas cepas híbridas. De genotipo ancestral universal común, surgieron dos genotipos diferentes que están representados hoy en día como DTUs I y II. Las cepas de estas DTUs subsecuentemente se hibridaron para producir DTUs IIa y IIc. Una segunda hibridación entre las cepas de DTUs IIb y IIc produjo las cepas DTUs IIId y IIe. (Westenberger et al, 2005)

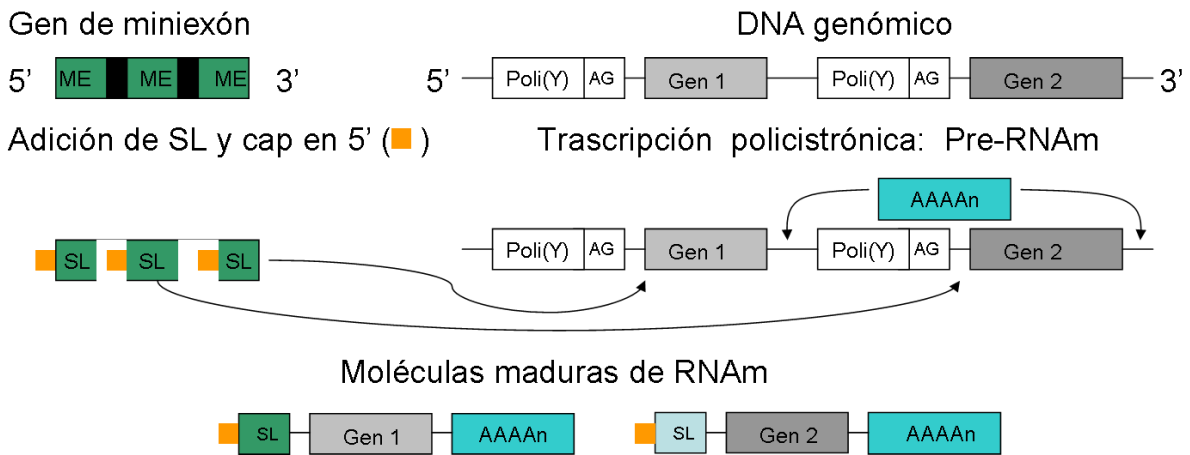
El análisis comparativo de las secuencias idénticas con las del genoma de la cepa Esmeraldo (subgrupo IIb) permitió distinguir en el genoma de CL Brener dos haplotipos los cuales son llamados Esmeraldo (S) y No-esmeraldo (P). La divergencia entre los haplotipos en las regiones codificadoras es aproximadamente de 2.2%. (Aslett et al, 2010; Weatherly et al, 2009; Westenberger et al, 2005).

#### 1.1.4. Organización genómica:

Las regiones de genes codificadores de proteínas se encuentran mayoritariamente agrupadas en tandem. Las regiones codificadoras están separadas por regiones intergénicas de aproximadamente 100 – 400 nucleótidos. Los genes se transcriben policistricamente (Haile y Papadopoulou 2007; Stiles et al, 1999).

La transcripción se lleva a cabo por tres tipos de ARN polimerasa. La ARN pol I transcribe los genes de ARN ribosomales (excepto es 5S), la ARN pol II transcribe los genes que codifican para proteínas y los genes del miniexón o “spliced leader” (SL), y la ARN pol III transcribe los ARN de transferencia, el ARN 5S y los ARN nucleolares pequeños (snoRNA).

En *T. cruzi*, las unidades polisitrónicas de ARNm son procesadas por mecanismos de *trans-splicing*, de lo que resulta que es la adición de un ARN pequeño SL (ARN de 39 nt) que confiere el “cap” al ARN mensajero procesado (Guanosina del extremo 5’ metilada en el carbono 7). El procesamiento en el extremo 3’ ocurre coordinadamente con el *trans-splicing* del transcrito génico adyacente en 3’ (Fig. 2). Los dos eventos dependen de una región rica en pirimidinas (poli(Y)), localizadas dentro de las regiones intergénicas o regiones sin traducir (UTRs). Se sabe que la mayoría de las UTRs presentan tamaños entre 50 a 500 nt donde se encuentra las regiones reguladoras de *trans-splicing* y poliadenilación. (Campos, 2008). Se ha reportado que el *trans-splicing* necesita la presencia de un dinucleótido (GT o AG) río abajo de la región poli(Y) (Campos et al, 2008; Huang y Van der PLoeg, 1991; Mandel et al, 2008)



**Fig. 2 Trans-splicing y poliadenilación.** La maduración del RNAm inicia con la transcripción de alguno de los genes de miniexón o “splice leader” (SL). Este es modificado en su extremo 5' con una guanosina metilada en el carbono 7 (cuadro naranja). Por otro lado en las regiones intergenicas de las unidades policistrónicas de RNAm (pre-RNAm), existen regiones ricas en pirimidina (Poly (Y)), las cuales son reconocidas por la maquinaria de splicing para realizar un corte. Río abajo de este sitio de corte se localiza un dinucleótido AG donde se lleva a cabo la unión de SL con el RNAm. Esta misma maquinaria de splicing realiza la poliadenilación del RNAm localizado río arriba. Cada RNAm maduro queda conformado por la secuencia SL, seguida de una región no traducida en 5' (UTR 5'), el marco abierto de lectura del gen, la región no traducida en 3' (UTR 3') y la cola de poli A.

### 1.1.5. Ciclo de vida:

El *T. cruzi* se desarrolla a través de un ciclo de vida complejo. Éste transcurre en vertebrados mamíferos y en invertebrados, se reconocen los siguientes estadíos:

- Epimastigote: Forma elongada con dimensiones de 20-40 x 3  $\mu\text{m}$ , el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo del parásito, arrastra la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta que se libera por el extremo anterior de parásito; este estadíos se desarrolla en el vector y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi*. (Fig. 3)
- Amastigote: Forma esférica u ovalada aproximadamente de 2-4  $\mu\text{m}$  que carece de flagelo libre; estadíos replicativo del parásito en el mamífero. (Fig. 3A)

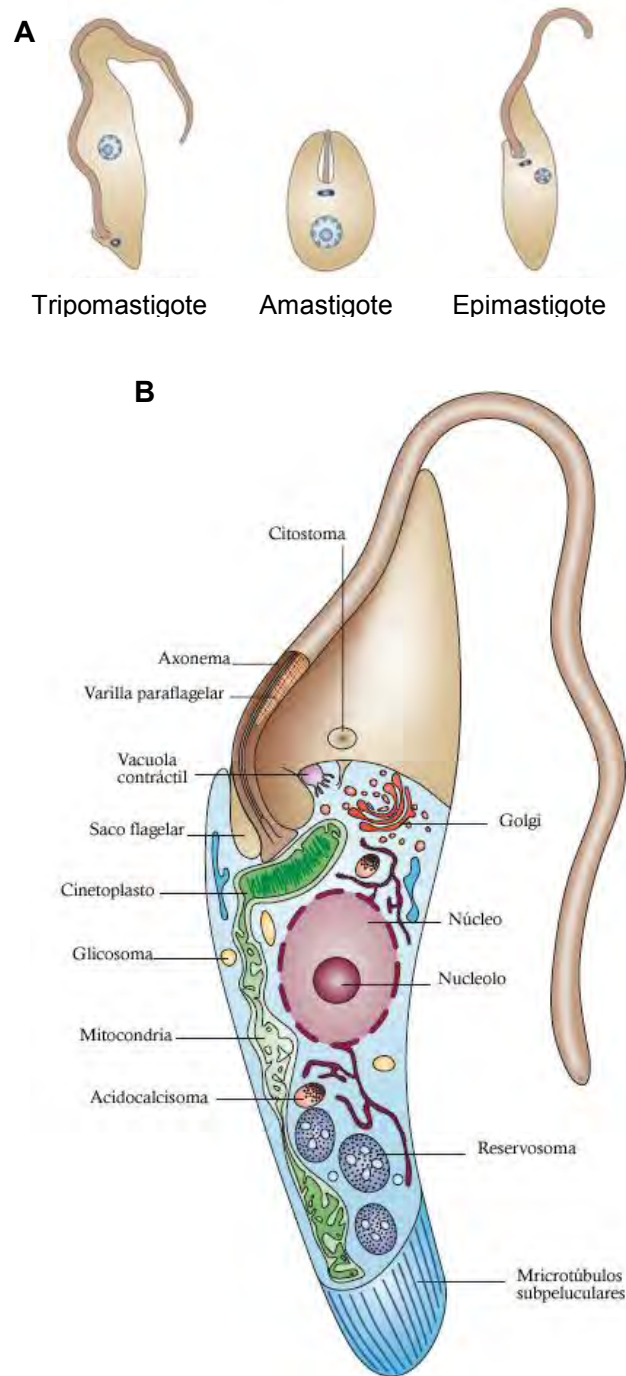


- Esferomastigote: Forma esférica con flagelo extracelular que bordea el cuerpo del parásito; estadíos replicativo presente en el estomago del insecto vector.
- Tripomastigote: Forma elongada de 20-25  $\mu\text{m}$  con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo del parásito, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión; estadíos presente en la circulación del mamífero y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico) y carece de capacidad replicativa (Fig 3A).

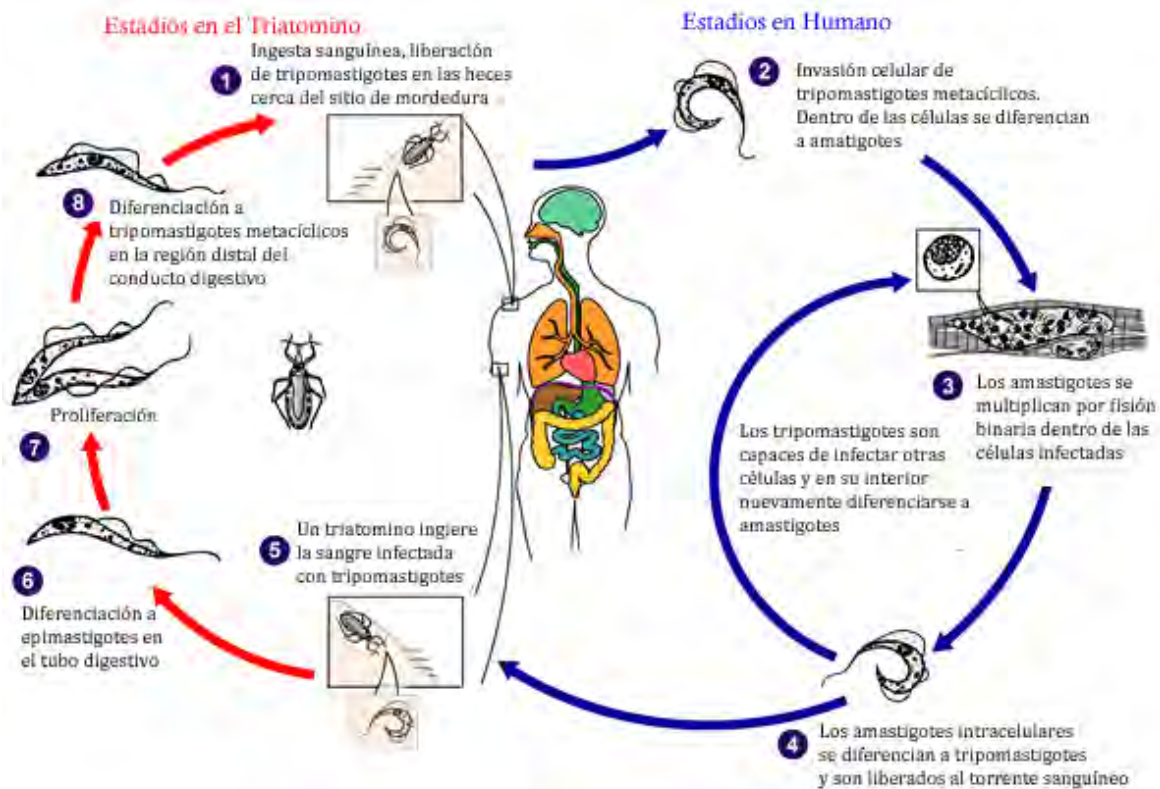
El epimastigote prolifera en el intestino de los insectos triatominos que se han alimentado de algún mamífero infectado (Fig. 4). El proceso de diferenciación a tripomastigotes inicia con el contacto de la membrana celular con proteínas específicas de la parte distal del intestino del insecto. Esta proteína origina una señal extracelular que se traduce como una señal intracelular inductora de la morfogénesis, este proceso se da en la parte final del intestino, los parásitos se transforman en formas infectivas y no proliferativas (tripomastigotes metacíclicos), capaces de infectar a los mamíferos hospederos. La transmisión del padecimiento se da cuando un vector infectado con *T. cruzi* defeca in situ durante ó después de una ingesta sanguínea. Excoriaciones de la herida o acceso a mucosas permiten que el parásito se establezca exitosamente en el hospedero (Fig. 5).

El contacto inicial entre el tripomastigote metacíclico o circulante y la célula hospedera es mediada por medio del reconocimiento de proteínas específicas, estas proteínas receptoras permiten a *T. cruzi* adherirse y penetrar en las células no fagocíticas (Storino y Milei, 1994). Cuando los tripomastigotes entran a las células mamíferas, cambian a formas proliferativas (amastigotes), que se replican intracelularmente. Los amastigotes se transforman nuevamente en formas no reproductivas e infectivas (tripomastigotes), los cuales lisan a la célula infectada y se liberan al torrente sanguíneo (Fig. 5). Las formas infectivas solo pueden

proliferar después de invadir nuevas células o después de transformarse en epimastigotes nuevamente. (Elias et al., 2001; Storino y Milei 1994).



**Fig. 3. Representación esquemática de los principales estadios de *T. cruzi*.** (A) Las principales formas celulares de los tripanosomátidos se definen por la forma de la célula, la presencia de flagelo, la posición del cuerpo basal, cinetoplasto y el núcleo. En general, el epimastigote de *T. cruzi* se encuentra en el vector, el tripomastigote en el hospedero y el amastigote en forma intracelular. (B) Representación esquemática de la sección longitudinal de la forma epimastigote de *T. cruzi*. Imagen modificada de: Docampo et al, 2005.



**Fig. 4. Ciclo de vida de *T. cruzi*.** Un insecto triatomino infectado defeca durante o después de la ingesta sanguínea, liberando trypomastigotes en sus heces cerca del sitio de la herida por mordedura. Los trypomastigotes entran en el hospedero a través de la herida o de las membranas mucosas. Dentro del hospedero, los trypomastigotes invaden células cercanas al sitio de inoculación, donde se diferencian a amastigotes. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria y se diferencian a tripomastigotes, los cuales lisan la célula y son liberados al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes infectan una gran variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en los nuevos sitios de infección. El insecto triatomino se infecta al alimentarse de sangre con parásitos circulantes de algún mamífero. La enfermedad de Chagas se localiza desde sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina, en la mayoría de las zonas rurales pobres de México, Centro América y Sur América, por lo que se considera una de las enfermedades que más afecta a todo el continente Americano. Imagen:

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>

Después de que el insecto se alimenta de la sangre de una persona infectada con *T. cruzi*, el parásito se diferencia de tripomastigote circulante a epimastigote dentro del tubo digestivo del insecto, y posteriormente a formas metacíclicas, en la region distal del tubo digestivo. Experimentalmente se ha logrado la diferenciación de epimastigote a tripomastigote metacíclico, incubando los epimastigotes en un medio pobre en nutrientes y ligeramente ácido que semeja al de la parte distal del intestino del insecto vector donde naturalmente se

diferencian a tripomastigotes (Storino y Milei, 1994). Algunos autores han logrado metaciclogénesis en medio de cultivo cuya concentración salina y contenido de monosacáridos es semejante a la presente en la orina del insecto (Ferreira et al, 2008; Elias et al, 2001; Storino y Milei, 1994).

En la diferenciación a tripomastigotes metacíclicos ocurren eventos en el parásito que le permiten transitar por un medio hostil como lo es el suero de los mamíferos. Ejemplo de esto es la resistencia al complemento (Storino y Milei, 1994).

## **1.2. Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas).**

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria hística y hemática producida por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta infección es transmitida por insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia *Triatominae* (Storino y Milei, 1994). Se estima que cerca de 50 000 personas mueren al año debido a esta enfermedad.

### **1.2.1. Fases de la enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas presenta generalmente tres estados en la infección humana por *T. cruzi*, primero hay un periodo de incubación de 4-10 días generalmente asintomática, posteriormente le sigue una fase aguda corta seguida de la fase crónica de larga duración, las dos fases son separadas por una fase asintomática llamada fase indeterminada (Cassab et al, 1999).

- Fase aguda: Esta fase dura de 1-3 meses, con frecuencia no es detectada debido a que los síntomas pueden ser inespecíficos. Sólo el 1-2% de todos los pacientes son diagnosticados. La fase aguda puede presentarse a cualquier edad. Frecuentemente se presenta una pequeña lesión llamada chagoma en el punto de entrada del parásito, si éste se encuentra a nivel del ojo, puede producirse un edema ocular unilateral llamado romaña. Los

síntomas observados son fatiga acompañada de fiebre continua o recurrente, anorexia, diarrea y vómitos. Los pacientes pueden presentar hepato-esplenomegalia moderada, edemas generalizados y adenopatías difusas. Hasta el 30% de los pacientes presentan anormalidades electrocardiográficas y/o radiológicas debidas a una miocarditis aguda que presenta diferentes grados de severidad. En niños menores de 2 años pueden presentar meningo-encefalitis cuya mortalidad puede llegar hasta un 50%. En caso de evolución favorable, los síntomas disminuyen espontáneamente entre 4-8 semanas sin que se presenten secuelas clínicas a corto plazo (Cassab et al, 1999).

- Fase intermedia: Esta fase comienza unas 8-10 semanas después de la fase aguda. Se caracteriza por la ausencia de síntomas. La serología es positiva y el parásito puede ser detectado por xenodiagnóstico en 20-60% de los casos. El enfermo tiene plena capacidad para realizar actividades físicas, sus electrocardiogramas y radiografías son normales. Las personas en esta fase constituyen un reservorio importante para mantener el ciclo de vida del parásito (Cassab et al, 1999).
- Fase crónica: En esta fase los parásitos penetran y se multiplican en las células de órganos vitales a menudo causando daños irreversibles de los tejidos, particularmente del sistema nervioso autónomo y de los músculos no estriados. Hay una reducida parasitemia después de 10-20 años de la infección inicial y el 30% de los casos puede evolucionar a daños cardiacos, digestivos o neurológicos. La miocarditis crónica es la forma más común de la cardiopatía chagásica. Las manifestaciones dependen del grado de daño al miocardio, provocando arritmia e insuficiencia cardiaca. Los síntomas mas frecuentes son: palpitaciones, mareos síncope, disnea, edema y dolor pectoral. La fibrilación es la consecuencia más frecuente que provoca la muerte súbita en los pacientes chagásicos crónicos. En la visceropatía chagásica el tejido comúnmente afectado es el esófago, con una dilatación progresiva acompañada de disfagia,

regurgitación, hipersalivación y dolor, otro tejido con gran incidencia es el colon, provocando perturbaciones peristálticas manifestando estreñimiento progresivo, meteorismo, así como fecalotas y vólvulus agudo en casos graves (megacolón). La neuropatía chagásica representa una destrucción neuronal que afecta los sistemas nerviosos central, periférico y autónomo; según la localización de las lesiones se puede observar la perturbación funcional del cerebelo, convulsiones y anormalidades psiquiátricas (Cassab et al, 1999).

### **1.2.2. Diagnóstico y tratamiento**

El diagnóstico de la infección aguda se lleva a cabo a través de la identificación por pruebas de laboratorio por medio de 1) el análisis al microscopio de sangre no coagulada del paciente en un frote sanguíneo bajo tinción de Giemsa; 2) el xenodiagnóstico, el paciente es intencionalmente picado por el insecto trasmisor no contaminado, después de 30 y 60 días las heces e intestinos son analizados para detectar tripomastigotes o epimastigotes; 3) por medio de inoculación de la sangre del enfermo en animales de laboratorio y la verificación de si desarrollan la enfermedad aguda; el crecimiento y multiplicación de posibles parásitos en medios de cultivo, por ejemplo, LIT (triptosa de infusión de hígado). Por los niveles tan bajos de parásitos en sangre, el diagnóstico de las etapas intermedia y crónica, la detección suele ser mas difícil, se han desarrollado técnicas moleculares como detección de ADN del parásito por PCR, y pruebas inmunológicas para detectar anticuerpos específicos.

Para el tratamiento las principales drogas usadas son los nitrofuranos (nifurtimox; Bayer) y los nitroimidazoles (benznidazole; Roche), que actúan a través de la inducción de daño oxidativo o reductivo del parásito; sin embargo, ambas drogas son altamente mutagénicas y causan efectos secundarios importantes. Una gran variedad de drogas estan en desarrollo por ejemplo inhibidores de síntesis y metabolismo (Croft et al, 2005). Existe una gran cantidad de investigaciones con el fin de desarrollar alguna vacuna.

### 1.3. *T. cruzi* como modelo biológico.

Los cinetoplástidos son un grupo bien conocido de protozoos flagelados los cuales divergieron hace aproximadamente 800 millones de años de otros eucariotas (Fernández et al., 1993). Estos microorganismos son distinguibles de otros protozoos por la presencia del mitocondrial (ADN-K). Quizá como consecuencia del largo tiempo de divergencia, los cinetoplástidos exhiben características biológicas raramente vistas en otros eucariontes como: edición del ARN (*trans-splicing*), variación antigénica entre especies, cambios morfológicos durante su ciclo de vida, expresión diferencial de genes, estructuración atípica del cistrón ribosomal, entre otros; constituyéndose en importantes modelos para el estudio de procesos biológicos básicos (Stevens et al, 2001; Fernández et al, 1993).

La familia *Trypanosomatidae*, agrupa organismos monogénicos y digenéticos (Maslov y Simpson, 1995; Fernández et al, 1993), patógenos para el hombre y animales (*Leishmania* y *Trypanosoma*), estos parásitos son frecuentemente estudiados debido a que constituyen unos excelentes modelo biológico de estudio para los organismos patógenos en el complejo campo del fenómeno de la morfogénesis de un parásito protozoario digenético y en estudios de inmunidad celular en insectos de su familia y es fácilmente cultivable.

Desde los inicio del grupo de trabajo del Dr. Roberto Hernández se ha interesado en la biogénesis del ribosoma (particularmente del ARN ribosomal) y en la estructuración del nucléolo utilizando como modelo experimental a *T. cruzi* cepa CL Brener, algunas de las contribuciones sobre el campo de estudio son: el aislamiento de las 3 moléculas grandes que conforman el ARNr (18S, 24S $\alpha$  y 24S $\beta$ ) y las 6 moléculas pequeñas (S1-S6) en *T. cruzi* (Hernández et al, 1990), primer grupo en utilizar secuencias génicas ribosomales para analizar relaciones filogenéticas entre miembros de la familia *Trypanosomatidae* (Gómez et al, 1991), la cuantificación del número de genes para ARNr de *T. cruzi*, encontrándole que

existen alrededor de 100 copias por núcleo (Castro et al, 1981), caracterización de la molécula de ARNr 5S correspondiente a la molécula de ARNr S5, anteriormente identificada (Hernández-Rivas et al, 1992), descripción de la estabilización de las moléculas de ARNr durante la fase estacionaria de cultivos de epimastigotes (Cevallos et al, 2005), como colaboradores del grupo del Dr. Luis Felipe Jiménez (Facultad de Ciencias, UNAM), se describió la naturaleza ultra estructural de nucleolo en *T. cruzi* en células proliferativas, en la cual se destaca un componente fibrilar denso y un componente granular (López-Velázquez et al, 2005).

#### **1.4. Características de los ribosomas:**

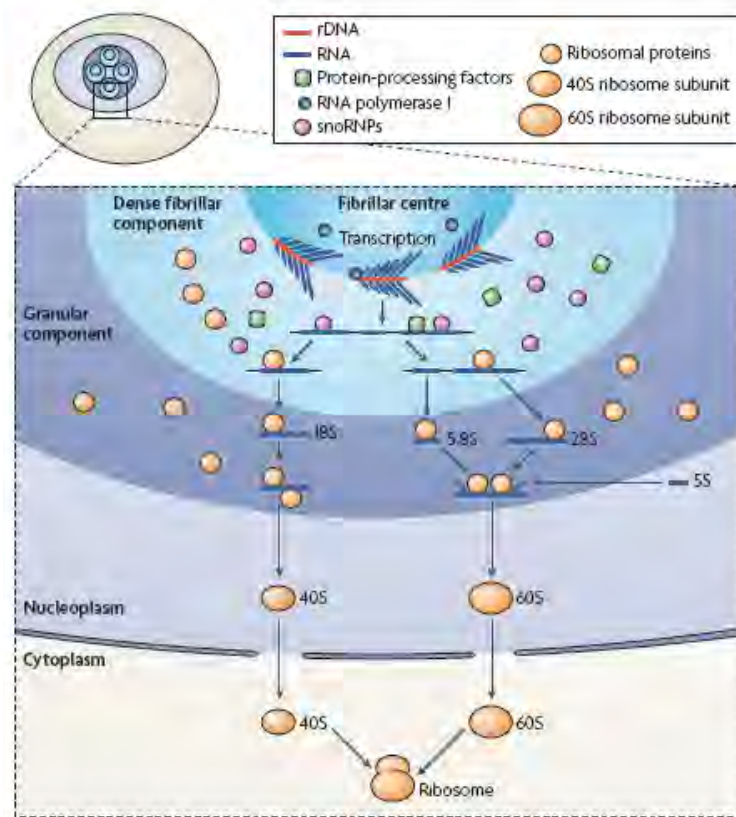
El ribosoma es un complejo ribonucleoprotéico y es la estructura celular encargada de generar proteínas. Los ribosomas procariontes son muy parecidos a los eucariontes en cuanto a tamaño y función. Cada uno de ellos están compuestos por una subunidad pequeña y una subunidad grande, que se mantienen juntas formando un complejo de una masa de varios millones de daltons. La subunidad pequeña se une al ARNm y a las moléculas de ARNt, mientras que la subunidad grande cataliza la formación de los enlaces peptídicos (Alberts et al, 2000).

Más de la mitad del peso del ribosoma es ARN, y cada vez es más evidente que el ARN ribosómico (ARNr) desempeña un papel central en las actividades catalíticas del ribosoma. Los ribosomas contienen un número elevado de proteínas (~49 proteínas en la subunidad mayor y ~33 proteínas la subunidad menor, número que varía dependiendo la especie), pero muchas de ellas tienen una secuencia poco conservada durante la evolución e incluso un número sorprendente de ellas no parecen ser esenciales para la función del ribosoma (Alberts et al, 2000).



### 1.4.1. Biogénesis de los ribosomas

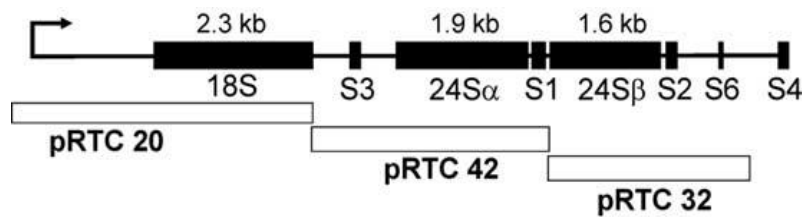
Los ribosomas citoplásmicos de organismos eucariontes representan el único componente subcelular formado por productos génicos de las tres ARN polimerasas. La síntesis de ribosomas inicia en el núcleo e involucra un gran número de pasos en los que se pueden mencionar el procesamiento del precursor del ARN ribosomal (pre-ARNr) y un ensamblaje secuencial de un gran número de proteínas ribosomales.



**Fig. 5. Modelo de la biogénesis de los ribosomas.** La transcripción del ADN ribosomal (ADNr) por la ARN pol I se produce en los centros fibrilares (FC) o bien al límite del componente fibrilar denso (DFC). El pre-ARN ribosomal (pre-ARNr) es modificado por las pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP) en el DFC. La maduración final del pre-ARNr por las snoRNP ocurre en su mayoría en el componente granular del nucleolo (GC). En el GC, la 5,8 S y 28S del ARN ribosomal (ARNr) se unen para formar la subunidad 40S del ribosoma. Las subunidades 40S y 60S del ribosoma son exportados al citoplasma, donde se unen al ARNm para formar los ribosomas funcionales. (Imagen: Boisvert et al, 2007)

En la mayoría de las células eucarióticas, primero se lleva a cabo la transcripción de las unidades en *tandem* del ADN ribosomal (ADNr) con ayuda de la ARN pol I, que origina el pre-ARNr inicial, tipo 47S, posteriormente es cortado en las moléculas 28S 18S y 5.8S, los cuales, son modificadas de manera postranscripcional por medio de interacción con las ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNP) y con ayuda de enzimas específicas, finalmente es ensamblado con las proteínas de envoltura para poder ser exportados hacia el citoplasma (Fig. 5). El ARNr 5S se encuentra codificado generalmente fuera de esta unidad y es transcrito por la ARN pol III (Boisvert et al, 2007; Reeder, 1992; Granneman y Baserga, 2004). Las proteínas ribosomales, como la mayoría de las proteínas, son traducidas en el citoplasma, posteriormente son enviadas al nucleolo donde se ensamblan con los componentes de ARNr para conformar las subunidades ribosomales.

En el caso de *T. cruzi*, el cistrón ribosomal muestra una organización particular y se hace evidente en un patrón de moléculas de ARNr más complejo (Fig 6). La complejidad surge de un proceso diferente de procesamiento con la liberación de espaciadores transcritos internos adicionales. La molécula 24S de la subunidad mayor (que equivale al 28S de la subunidad grande en la mayoría de las células eucariontes) presenta una discontinuidad interna que libera las moléculas  $\alpha$  y  $\beta$  (24S $\alpha$  y 24S $\beta$ ), además se presentan 6 moléculas pequeñas de ARNr: S1 (small rARN1), S2, S3, S4, S6 codificadas en el cistrón y S5 codificada como una unidad independiente de transcripción. Ésta corresponde al ARN 5S (S, unidad Svedberg de sedimentación). La molécula pequeña de ARNr S3 corresponde al ARNr 5.8S de otros eucariontes. El ARNr 18S de *T. cruzi* es equivalente al de los demás eucariontes (Cevallos et al, 2005; Hernández et al, 1993; Macedo et al, 2004; Uliel et al, 2004).



**Fig. 6. Diagrama del cistron de ARN ribosomal de *T. cruzi*.** Las regiones representadas con recuadros negros representan las regiones transcritas identificadas como la subunidad pequeña de ARNr (18S), la subunidad grande de ARNr (24S $\alpha$  y 24S $\beta$ ), ARNr 5.8S (S3), y los ARNr pequeños (S1, S2, S4 y S6). Las regiones codificadoras están unidas por delgadas líneas que representan los espaciadores internos transcritos (ITS). El punto de inicio de la transcripción está indicado por una flecha. Las barras marcadas como pRTC muestran tres fragmentos genómicos previamente clonados en el laboratorio del Dr. Roberto Hernández. (Hernández et al, 1988).

#### 1.4.2. Maduración de ARNr:

El nucléolo ha sido considerado como la fábrica productora de ribosomas donde se realiza la síntesis y el procesamiento del pre-ARN ribosomal. En la actualidad esta percepción se ha amplificado, considerando al nucleolo como una estructura dinámica donde se realizan gran número de actividades, tales como: el transporte de moléculas que residen en el núcleo hacia el citoplasma, la modificación de ARNr, el ensamblaje de ribonucleoproteínas, el reclutamiento de proteínas reguladoras y el control del envejecimiento celular (Rosete et al, 2007). El mecanismo fundamental del proceso de maduración de ARNr no es conocido completamente, pero algunas de las vías se han localizado en compartimentos específicos (Fig. 5).

Se sabe que la transcripción de un ARNr precursor se lleva a cabo por la ARN pol I en los centros fibrilares (FC) del nucleolo, esta estructura es la más interna, y esta compuesta de pequeñas fibras de aproximadamente 50Å. La formación del pre-ribosoma se lleva a cabo en el componente fibrilar denso (DFC) alrededor de los centros fibrilares, el cual se observa como una capa compacta compuesta principalmente por fibrilarina, aquí se forman pequeños complejos entre pequeñas secuencias de ARN de menos de 250 nucleótidos (snoRNAs) y las

pequeñas proteínas nucleolares (snoRNPs), las cuales participan en los eventos que generan las modificaciones del pre-ARNr durante su maduración. El ensamblaje de las partículas pre-ribosomales ocurre en el compartimiento granular (CG), el cual contiene gránulos de 15-20nm de diámetro (Alberts et al, 2000; Bachellerie y Cavallé, 1997; Jansen et al, 1991; Raška et al, 2006; Rosete et al. 2007).

#### **1.4.2.1. Pequeños ARN nucleolares (snoRNAs)**

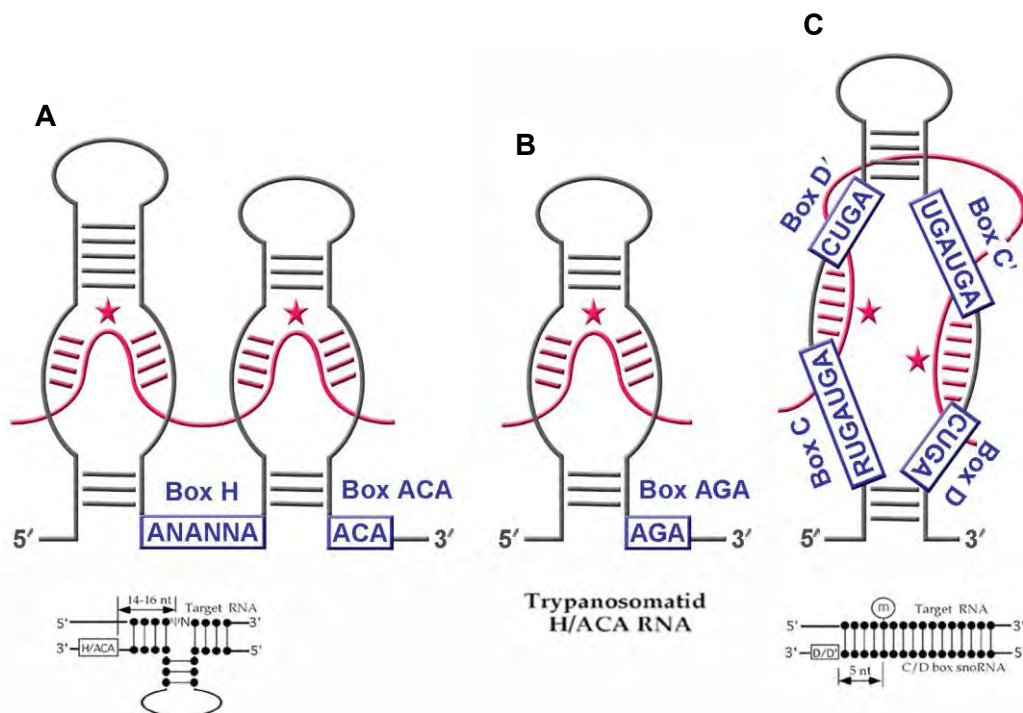
La mayoría de las moléculas de ARNr sufren modificaciones post-transcripcionales, siendo estas en su mayoría la 2'-O-metilación en la ribosa y la pseudouridinilación. La mayoría de las modificaciones están situadas dentro dominios conservados y funcionalmente importantes. La ubicación de estas modificaciones es guiada por dos clases de snoRNA.

La primera clase esta definida por la presencia de los motivos conservados H/ACA, donde la parte llamada caja H presenta la secuencia ANANNA (N: cualquier nucleótido). Estas secuencias conservadas unen dos regiones contiguas con estructuras en forma de tallo (Fig. 7A). El modelo aceptado de modificación es que se lleva a cabo un apareamiento entre la región del ARNr con secuencias en forma de burbujas intermedias a los dos tallos. En la parte central de esta interacción, en dos posiciones no apareadas se encuentra la uridina blanco de isomerización (i.e., pseudouridinilación). La región ACA se encuentra a 3 nucleótidos del extremo 3' terminal (Bachellerie y Cavallé, 1997; Reichow et al, 2007, Uliel et al, 2003). Los tripanosomátidos poseen snoRNAs H/ACA con un solo tallo (H/ACA-like snoRNA). Éstos presentan un motivo AGA en lugar de ACA en el extremo 3' (Fig. 7B), sin embargo se consideran dentro de esta clase estructural (Uliel et al, 2003).

Las metilaciones del ARNr son dirigidas por la segunda clase estructural de snoRNA, que tienen las secuencias conservadas C y D (C: 5'RUGAUGA3', R: purina; y D: 5'-CUGA3'). Las secuencias C y D se encuentran en los extremos 5'

y 3' del snoRNA respectivamente, flanquean la región a la cual se aparea el ARNr que será modificado. Los nucleótidos de pre-ARNr que marcan los sitios que serán modificados se unen de forma complementaria una región en forma de burbuja que se encuentra dentro de un tallo formado por el snoRNA (Fig. 7C). Los snoRNA se encuentran en complejos estables junto con 4 proteínas que sirven como envoltura: fibrilarina, Nop56, Nop58 y 15.5 K (Bachellerie et al, 1995; Uliel et al, 2003). La mayoría de los snoRNA C/D tienen un segundo set de secuencias conservadas en la región central del ARN, que son llamadas las cajas C' y D' (Raška et al, 2006; Reichow et al; 2007; Uliel et al, 2003).

Se ha observado que la complementariedad de bases entre el pre-ARNr y el snoRNA se lleva a cabo con 10-21 bases y la metilación se lleva a cabo exactamente a 5 nucleótidos de distancia de los motivos D o D' (Regla 5+). (Dunbar et al, 2000; Reichow et al, 2007, Uliel et al, 2003).



**Fig. 7 Estructura secundaria de los snoRNAs y sus reglas de orientación.** (A) H/ACA snoRNA que guía la pseudouridilación. Se indican las cajas H y ACA. Se muestran el ARN objetivo y el sitio de pseudouridilación ( $\Psi$ ). La letra N designa cualquiera de los 4 nucleótidos en la bolsa de pseudouridilación. (B) La estructura secundaria del snoRNA H/ACA-like en tripanosomátidos compuesta por una simple tallo y con el motivo AGA en el extremo 3'. (C) C/D snoRNA que guía la 2'-O-metilación. Se muestran las cajas C/D

y C/D' y el nucleósido metilado (m) en la cadena de ARN objetivo. La distancia entre el sitio de metilación y las cajas D/D' se da por la "regla 5+" (Imagen modificada: Uliel et al, 2003; Reichow et al, 2007).

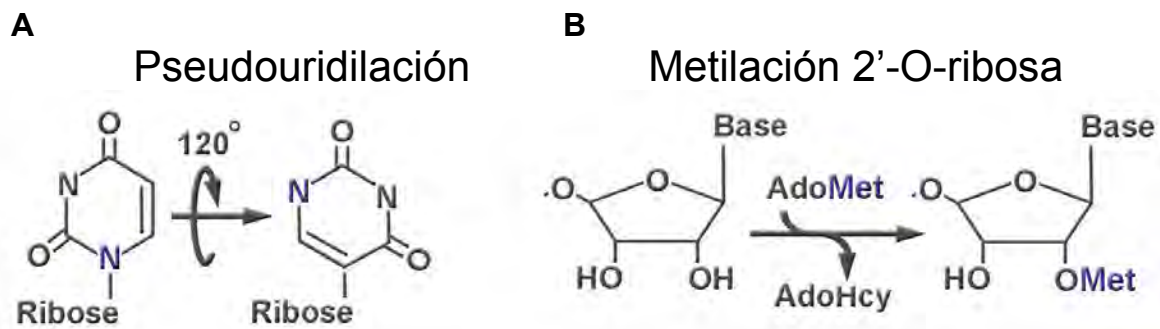
#### **1.4.2.2. Ribonucleoproteínas pequeñas (snoRNP):**

Es importante resaltar que la modificación de los pre-ARNr no es realizada por los snoRNA, sino por enzimas específicas, como la pseudouridina sintasa (Cbf5p) que realiza la conversión de uridina a pseudouridina (pseudouridilación:  $\Psi$ ) o la metiltransferasa (fibrilarina), para la 2'-O-metilación en la ribosa (Fig. 8), estas enzimas se les nombra como pequeñas ribonucleoproteinas (snoRNP). Su clasificación esta basada al componente snoRNA (H/ACA ó C/D) al que se unen (Reichow et al, 2007; Uliel et al, 2003).

Los eventos de pseudouridilación o conversión de uridina a pseudoruridina, en el ARNr son numerosas en eucariontes pero pocas en bacteria y archea, se ha observado que las regiones modificadas son regiones conservadas evolutivamente en el ARNr de eucariontes, también que éstas regiones no están asociadas con alguna región involucrada en una función particular. Existe una repercusión de esta modificación, ya que, aumenta la sensibilidad a los cambios de temperatura. Como se mencionó anteriormente, los miembros de la familia snoRNA H/ACA como la enzima Cbf5p, son las responsables de la pseudouridilación (Bachellerie y Cavallé, 1998).

La metilación de ribosa, ocurre siempre en la posición 2'hidroxilo. Ésta sucede frecuentemente en eucariontes y es limitada en bacterias. Se postula que estas modificaciones son importantes en el doblamiento del ARNr maduro y ayudan en su asociación con las proteínas chaperonas que lo envuelven. La enzima que lleva a cabo la metilación del pre-ARNr es la fibrilarina (Fig. 7C), esta reacción se lleva a cabo a 5 nucleótidos de distancia de la caja D o D' del snoRNA en la secuencia complementaria de pre-ARNr (Bachellerie y Cavallé, 199; Bachellerie y Cavallé, 1998; Barth et al, 2008; Dunbar et al, 2000; Reichow et al, 2007).

Se cree que existe una relación entre el número de modificaciones en el ARNr y los cambios de temperatura a los cuales el organismo está sujeto por ejemplo las plantas que presentan gran número de metilaciones y están expuestas a cambios climáticos. Es probable que los cambios de temperatura durante el ciclo de vida de los tripanosomatidos (temperatura de insecto: 26°C; temperatura de mamífero: 37°C) tengan relación con la gran cantidad de modificaciones de su ARNr (Uliel et al, 2004).



**Fig. 8. Modificaciones post-transcripcionales más abundantes en los ARN ribosomales.** (A) La isomerización de la uridina en  $\Psi$  requiere un giro total de la base uracilo. (B) La proteína metiltransferasa (fibrilarina) cataliza la 2'-O-metilación en la ribosa de los ARNr, al convertir AdoMet en S-adenosilhomocisteína (AdoHcy). (Imagen modificada: Reichow et al, 2007)

#### 1.4. Fibrilarina

La fibrilarina es una proteína de 34 – 36 kDa que se encuentra en el componente fibrilar denso del nucleolo. Se descubrió por primera vez en *Physarum* y posteriormente en células de mamíferos. En humanos se descubrió gracias al suero autoinmune de pacientes con escleroderma. Su actividad enzimática fue determinada por la asociación entre la proteína y los snoRNAs. Con análisis cristalográficos se confirmó su estructura y se mostró su similitud con enzimas que tienen la actividad de metilar nucleótidos en otras especies (Reichow et al, 2007; Tollervey et al, 1991).

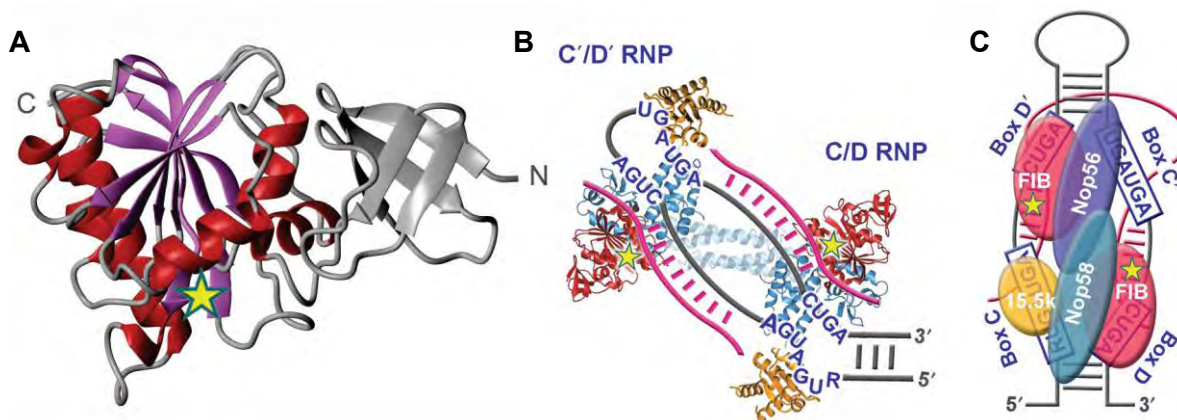
#### **1.4.1. La fibrilarina, snoRNP C/D metiltransferasa:**

La fibrilarina esta formada por un dominio catalítico integrado por 7 láminas beta plegadas rodeadas por 3 hélices alfa de cada lado, esta estructura es similar a las enzimas catalizadoras de la metilación de una gran variedad de sustratos nucleofílicos (incluyendo a ácidos nucleicos y proteínas). El donador del grupo metilo es el cofactor S-adenosilmetionina (AdoMet). En células eucariontes se ha observado que en la estructura primaria de fibrilarina existe una región rica en glicina y arginina (GAR) cerca del extremo N terminal, el GAR muestra una gran variabilidad en ortólogos de otras especies, y generalmente en estudios cristalográficos la región GAR no es representado.

La fibrilarina, para catalizar la metilación del ARN, forma un complejo activo (snoRNP C/D fibrilarina) al asociarse con 3 proteínas: 15.5kDa, Nop56 y Nop58, que son esenciales para estabilizar la unión entre el ARN y fibrilarina. La estructura que resulta entre la fibrilarina y Nop56 resulta en la asociación con otro complejo de fibrilarina de tal forma que las proteínas Nop56 y Nop58 reconocen las cajas C y C' respectivamente, mientras cada copia de fibrilarina interactúa con los motivos D y D'. (Uziel et al, 2004)

El complejo de fibrilarina reconoce las regiones que forman la ARN de doble cadena (entre pre-ARNr y el snoRNA específico). Esto hace pensar en el reconocimiento de las metiltransferasas de ADN, sin embargo en este caso el mecanismo enzimático aún no se ha determinado. La mayoría de las reacciones de las metiltransferasas se llevan a cabo por la vía de sustitución tipo  $S_N2$ , donde el grupo metilo activado de AdoMet sustituye al grupo saliente del aceptor nucleofílico (en este caso el grupo hidroxilo de la ribosa 2'-OH del ARN), dentro del sitio de reconocimiento se encuentra un aspartato (que se cree lleva a cabo la desprotonación del 2'-OH nucleófilo y/o estabilizar la interacción con AdoMet) altamente conservado en las secuencias de aminoácidos de fibrilarina en varias especies (Reichow et al, 2007).





**Fig. 9 Fibrilarina, snoRNP C/D Metiltransferasa.** (A) Estructura cristalográfica de la fibrilarina arquea (1FBN). Los principales elementos de la estructura se identifican en colores (Rojo:  $\alpha$ -helices; violeta:  $\beta$ -plegadas; gris: regiones variables). La S-adenosilmetionina (AdoMet) se une al sitio conservado (estrella amarilla) de esta enzima. Los detalles de la interacción con los complejos snoRNA-ARNr no son conocidos. (B) En la estructura cristalográfica del C/D snoRNP de fibrilarina con las proteínas de envoltura se muestran las cajas C/D y C'/D' del snoRNA (azul), que guían la metilación del nucleótido del ARNr (rosa). La estructura cuaternaria del complejo Fibrilarina-Nop56/Nop58-Fibrilarina, posiciona 2 sitios catalíticos de fibrilarina sobre el ARNr (estrella amarilla). (C) Estructura pseudo-simétrica propuesta en el ensamblaje de la C/D snoRNP. Aparentemente la proteína 15.5K únicamente se une al snoRNA. Los parálogos Nop56 y Nop58, reconocen los elementos de las cajas C y C' respectivamente, las copias de fibrilarina (Fib) interactúan con cada caja D y D', consistentemente con las participaciones de los centros catalíticos (Imagen modificada: Uliel et al. 2004).

Es importante recalcar que uno de los principales intereses del laboratorio del Dr. Roberto Hernández se centra en la biogénesis de ribosomas y en la estructuración del nucléolo de *T. cruzi*. Este tipo de estudios se han realizado en otros organismos y han usado la fibrilarina como marcador de las funciones nucleolares (Barneche et al, 2000, David et al, 1997; Dunbar et al, 2000; Jansen et al, 1991; Jimenez-García et al, 2008; Tollery et al, 1991).

#### 1.4.2. Fibrilarina en *T. cruzi*

Los genes de fibrilarina se encuentran anotados en el genoma accesado de *T. cruzi* (CL Brener), en la base de datos disponible en el sitio:

<http://www.genedb.org/>, cada alelo está identificado con una clave de acceso o ID, las cuales son: Tc00.1047053509715.40, Tc00.104705351015.50, Tc00.1047053506211.250 y Tc00.1047053511287.150.

El gen con ID Tc00.1047053509715.40, esta localizado en el cromosoma 4, de haplotipo No-esmeraldo, entre los nucleótidos 90020 – 90973, por lo que cuenta con 951 pb, (Localización cromosómica: TcChr4-P; 90021 – 90972). Se reporta en la secuencia deducida de aminoácidos que el gen codifica para una proteína de 316 aa, con un peso de 34.05 KDa y un punto isoeléctrico de pH= 9.9 (<http://www.genedb.org/>).

El gen con ID Tc00.104705351015.50, esta localizado en el cromosoma 4, de haplotipo Esmeraldo, entre los nucleótidos 90147 – 91064, por lo que cuenta con 915 pb, (Localización cromosómica: TcChr4-S; 90148 - 91063). El gen codifica para una proteína de 304 aa (secuencia deducida de aminoácidos), con un peso de 32.45 KDa y un punto isoeléctrico de pH= 9.92 (<http://www.genedb.org/>).

El gen con ID Tc00.1047053511287.150, esta localizado en el cromosoma 40, de haplotipo No-esmeraldo, entre los nucleótidos 467142 – 468020, por lo que cuenta con 876 pb, (Localización cromosómica: TcChr40-P; 467143 - 468019). El gen codifica para una proteína de 291 aa (secuencia deducida de aminoácidos), con un peso de 30.5 KDa y un punto isoeléctrico de pH= 9.97 (<http://www.genedb.org/>).

El gen con ID Tc00.1047053506211.250, esta localizado en el cromosoma 40, de linaje tipo Esmeraldo, entre los nucleótidos 467413 – 468294, por lo que cuenta con 876 pb, (Localización cromosómica: TcChr40-S; 467414 – 468293). El gen codifica para una proteína de 292 aa (secuencia deducida de aminoácidos), con un peso de 30.5 KDa y un punto isoeléctrico de pH= 9.97 (<http://www.genedb.org/>).

Las secuencias a nivel de nucleótidos y aminoácidos se encuentran en el Anexo I y IV respectivamente, las características generales de los genes de fibrilarina en *T. cruzi* (CL Brener) que se encuentran en la base de datos de genedb, y se resumen en la Tabla 1.

ID	Haplotipo	Localización cromosómica	# de bases	# aa	Peso
Tc00.1047053509715.40 (Fib 40)	No-esmeraldo	TcChr4-P; 90021 – 90972	951 pb	317 aa	34 kDa
Tc00.1047053510105.50 (Fib 50)	Esmeraldo	TcChr4-S; 90148 - 91063	915 pb	305 aa	32 kDa
Tc00.1047053511287.150 (Fib 150)	No-esmeraldo	TcChr40-P; 467143 - 468019	876 pb	292 aa	30 kDa
Tc00.1047053506211.250 (Fib 250)	Esmeraldo	TcChr40-S; 467414 – 468293	879 pb	293 aa	30 KDa

**Tabla 1. Características generales de los alelos de fibrilarina en *T. cruzi* (CL Brener).** Información general encontrada en la base de datos de <http://www.genedb.org/> de los alelos de fibrilarina en *T. cruzi* (CL Brener). Entre paréntesis se encuentra la clave asignada en este trabajo para el fácil manejo de los genes.

## **2. Hipótesis.**

La hipótesis es que la expresión de fibrilarina se encuentre regulada para que esta se sintetice en concierto con condiciones de proliferación celular.

### **3. Objetivo General.**

Caracterizar molecularmente el sistema génico de fibrilarina de *T. cruzi*

#### **3.1. Objetivos Específicos:**

- Del genoma accesado de *T. cruzi* caracterizar las regiones genómicas (*contig*) que contienen a fibrilarina.
- Amplificar y caracterizar secuencias específicas de cada par de alelos.
- Analizar la expresión de ARNm codificador de fibrilarina durante la curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.
- Analizar la expresión de ARNm codificador de fibrilarina en formas diferenciadas de tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*.

## 4. Material y métodos.

### 4.1. Cultivos

Se obtuvieron epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL Brener (TINF/BR/1963/CL-Brener) a partir de medios de cultivo LIT (liver infusion triptone medium) a una temperatura de 28°C complementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, Penicilina 100U/ml, Estreptomina 100 µg/ml y hemina. El cultivo se monitoreo mediante cuenta celular en cámara de Neubauer. Dentro del sistema experimental usado se define como fase logarítmica como el punto en que el cultivo alcanza una densidad entre 8-10 x10<sup>6</sup> células/ml y fase estacionaria cuando, al hacer la cuenta, no registra un aumento en su densidad por 72 h (aproximadamente 80-100 x10<sup>6</sup> células/ml).

Para obtener cultivos *T. cruzi* enriquecidos en formas diferenciadas de tripomastigotes, primero se cosecharon las células de un cultivo de epimastigotes en fase logarítmica por medio de dos centrifugaciones a 4500x g durante 10 min a 4°C en rotor SS-34 Sorvall y dos lavados con PBS 1x entre cada centrifugación, el botón de células obtenido se resuspendió en medio M-16, el cual fue incubado por una semana a 28°C, concurrido este tiempo se cosecharon las células nuevamente para su procesamiento (Astolfi et al, 1984)

Los cambios morfológicos en la metaciclogénesis del parásito se monitorearon mediante la tinción con el set Hema 3 (Fisher Diagnostic), que es una tinción similar a la de Wright y Wright-Giemsa. Los parásitos se cosecharon mediante dos centrifugaciones a 500x g durante 6 min en 2 tubos Eppendorf, la células se lavaron entre cada centrifugación con PBS pH 7.4. Se colocaron 15 µl de la suspensión de células en un portaobjetos y se deshidrataron las muestras a temperatura ambiente. Una vez que se secaron las muestras, el portaobjetos se sumergió 5 veces dentro de cada solución del set Hema 3. Finalmente la observación y captura fotográfica se realizó con un microscopio de campo abierto (Olympus).

## **4.2. Extracciones de ácidos nucleicos**

### **4.2.1. Extracción de ADN genómico**

Las células usadas fueron cosechadas a partir de un cultivo de fase logarítmica tardía ( $30 \times 10^6$  cel/ml) con  $10^9$  células, por centrifugación a 4500xg durante 10 min a 4°C en rotor SS-34 Sorvall. Posteriormente las células fueron lavadas en PBS 1x y se resuspendieron en amortiguador de lisis [Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 50mM, EDTA 50mM (pH 9.0), Tritón x-100 4%] con proteinasa K, se incubaron a 37°C toda la noche. La extracción de ácidos nucleicos se realizó primero con fenol (pre-equilibrado con Tris-HCl 0.1 M pH 8.0), la segunda extracción fenol:cloroformo 1:1 y finalmente con un volumen de cloroformo. El ADN genómico se precipitó con  $MgCl_2$  y se resuspendió en Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 0.2mM, el ARN presente fue digerido con ARNasa pancreática (20 microgramos/ml) por 1h a 37°C (Medina-Acosta y Cross, 1993)

### **4.2.2. Extracción de ARN total con Trizol**

Se siguió la curva de crecimiento de 4 cultivos paralelos de *T. cruzi*, se extrajo el ARN total con trizol en diferentes puntos de la curva, de tal forma que se obtuviera ARN de epimastigotes en Fase Logarítmica (FL) y Fase Estacionaria (FE), por otra parte se extrajo ARN total de cultivos enriquecidos con tripomastigotes metacíclicos (Mc).

Durante las extracciones se hizo uso de guantes estériles en todo momento, el material usado fue previamente lavado con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y la cristalería horneada a una temperatura de 60°C por lo menos 12 horas antes de realizar la metodología, esto con el fin de evitar la degradación del ARN que se extrajo. Los parásitos fueron cosechados por centrifugación (3500xg por 10 mins) en centrifuga Beckman Coulter, modelo Allegra 21R. El botón celular fue lavado con PBS 1x frío y se transfirió a un tubo Eppendorf. Dicha

suspensión de células fue centrifugada nuevamente a 12 000 x g por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Se agregó un mililitro de Trizol y se homogenizó cada tubo por pipeteo. Después de incubarse a temperatura ambiente por 5 minutos se adicionó 200  $\mu$ l de cloroformo. Los tubos se agitaron vigorosamente por 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Las muestras se centrifugaron por 15 min a 12 x g en el cuarto frío. Posteriormente se recuperó la fase acuosa y el ARN se precipitó adicionando 500  $\mu$ l de isopropanol. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó en frío a 7500 x g durante 10 min. El sobrenadante se eliminó por decantación. El ARN precipitado se resuspendió en un volumen apropiado de agua tratada con DEPC (50 – 100  $\mu$ l, dependiendo la cantidad de ARN obtenido). Para determinar la cantidad e integridad de ARN purificado de las muestras, primero se midió la concentración de las muestras con ayuda de un espectrofotómetro (ND-1000, NanoDrop) posteriormente se corrió un gel de agarosa al 0.8% con 2  $\mu$ g de muestra, se considera una extracción de ARN exitosa cuando al teñir el gel con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml, en H<sub>2</sub>O-DEPC) y colocarlo en el transiluminador UV se observan las 3 especies mayores de ARN ribosomal (18S, 24S $\alpha$ , 24S $\beta$ ) que son muy abundantes y fácilmente visibles (Cevallos et al, 2005).

### **4.3. Obtención de sondas específicas para los genes de fibrilarina**

#### **4.3.1. Amplificación por PCR de fragmentos de los genes de fibrilarina**

Una observación empírica previa (Ana María Cevallos, comunicación personal) sugiere que el ADN genómico cortado con alguna enzima de restricción es un mejor templado para amplificar regiones específicas. El ADN genómico se digirió previamente con *EcoRI*. Se utilizó *EcoRI* debido a que esta enzima no corta la región de interés en los genes a amplificar. Para realizar la digestión, a un tubo Eppendorf se le colocaron 2  $\mu$ g de ADN genómico junto con 1  $\mu$ l de 10x Amortiguador React 3 (invitrogen), 0.5  $\mu$ l enzima *EcoRI* (invitrogen), y se llevó a un volumen final de 10  $\mu$ l con agua bidestilada y se incubó a 37°C por toda una noche.



El diseño de los oligonucleótidos iniciadores específicos de los pares de genes de fibrilarina y la reacción de PCR fueron realizadas por la Dra. Evelyn Fein. Las características de los oligonucleótidos empleados y la región que se deseaba amplificar de cada par de genes homólogos de fibrilarina se encuentran en la Tabla 2.

El protocolo usado para las reacciones de PCR es el siguiente:

A dos tubos de PCR (Tubo F50 y Tubo F250), se les adicionó siguiente mezcla de reacción: Tubo F50: 1µl del oligonucleotido en sentido (Fib50F) más 1 µl del oligonucleótido reverso (Fib50R), cada oligonucleótido tenía una concentración de 100µM, además se agregó 1µl de ADN genómico digerido, 5µl de Amortiguador Rxn PCR 10x (invitrogen), 3µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µl de taq polimerasa (invitrogen), 1 µl de dNTPs (10mM) y por último 37µl de agua bidestilada para alcanzar un volumen final de 50µl; Tubo F250: 1µl del oligonucleótido en sentido (Fib250F) más 1 µl del oligonucleótido reverso (Fib250R), cada oligonucleótido tenía una concentración de 100µM, los demás reactivos fueron agregados en la misma concentración y cantidad que el tubo anterior.

El programa seguido por el termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) para la reacción de PCR consistió de siete pasos; una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94° C (Paso 1), seguida por otra desnaturalización corta de 30 segundos a 94°C (paso 2), renaturalización por 30 segundos a 60°C (Paso 3), una extensión a 72° C por 1 min (paso 4), y se repitieron los pasos 2 al 4, 29 veces (Paso 5), una extensión final de 72°C por 10 mins (paso 6) y un enfriamiento a 4° C.

Oligonucleótidos específicos para los genes:		
Tc00.104705351015.50 y Tc00.1047053509715.40		
En sentido	Región amplificada de Tc00.104705351015.50	Producto
Fib50F: 5' CCCGAAGGTATGTTTATGC 3'	1 ATGAATTCTC ACTGCGATAT CGAATTTAAG AATAGCGCAA TCGGTGGAGG 51 ATTCGGTCTG GGAGGGTTTC GCGGTGGTGG AAGAGGCGGT GGTTCCTCTG 101 CACGAGGTCC TGGCGGTGCG TCACGAGGCG CTGGAAGGGG TGGTCCTGGC 151 CGTGGAGGGC GGGGAGGCCG CCGTGGGGGT GCTGGTGCCA AGGTGTGTGT 201 GGAACCTCAC ATGCTTCACC CTGGAGTATT TATTTCCAAA GGAAGGCCG 251 ATTCGCTTTG TACTCTGAAC ATGGTTCCTG GAGTCTCAGT TTACGGAGAA 301 AAAAGGATTG AACTAGGGGC AACGCAAGGT GGTGATGAGA AGAAAGAATA 351 TCGTCTTTGG AATCCATATC GTTCAAAGCT TGCCCGTGCC ATTTATGCTG 401 GTGTGGGAG TATTCATATG AAACCAGGAT CGAAGGTTC TTTATTTGGG 451 GGTGCAAGCG GTACAACGTG GAGTCATGTG AGTGACTTGG TTGGACCCGA	Tc50Fibr: 356pb
Tm 59.3°C	501 AGGTATGGTT TATGCGATAG AGTTTTCGAA TCGCAGTGGT CGCGATCTTG 551 TTGATATGTC GAAAAGACGG CCCAACATTG TTCCCATAT TGAAGATGCT 601 CGTTATCCCA TGAAGTATCG AATGCTTGTG CCTATGGTCC ATTCCGTATT 651 TATGGATGTT GCCCAACCAG ATCAAGCAGC TATTCTTGCT CTTAATGCAC 701 AGGCATTTTT GAAGAACGGA GGCCATTATG TAAATTTCAAT CAAGGCAAAAC 751 TGTATTGATT CAACCTTGGA GGCTCCTGTT GTGATTGCAT CCGAATTGAA 801 TAAATTAAGA AAGACCCTT TAAAGCCTTT AGAACAAGCC TCACTTGAGC 851 GGTTTGAAAG GGATCACGCC GTCGTGGTTG GGGTATATCG GTCCGTTAAG 901 AGGAAGACTG AATGA	
Reverso		
Fib50R: 5' GGCTCAAGTGAGGCTTGTTTC 3'		
Tm 60°C		
Oligonucleótidos específicos para los genes:		
Tc00.1047053506211.250- Tc00.1047053511287.150		
En sentido	Región amplificada de Tc00.1047053506211.250	Producto:
Fib250F: 5' CTGGCGACAAAGTCCCTAGTGCC 3'	1 ATGCGCGGAG GCCGTGGTGG CCGAGGTCGC GGAGGTCGCG GCGGTGGACG 51 TGGTGGTGGG CCGGGTGGTG GACGCGGTGG TGGTCGCGGC GGTGGACGTG 101 GCGGTGGTGG TGGACGTGGC GGTGGTGGAC GTGGCGGTGG ACGTGGGGGG 151 AGTTCGGCGG TCGGGGGTAA CGTTTTTCAG CCTCACGCTC GCATGCGTGG 201 ATGCTACCTG CTTGCCGGCA AAGATACCCT GGCGACAAAG TCCCTAGTGC 251 CTGGCGTTTC CATCTACGGG GAAAAGCGTG TCAGTGGCAC CATTGCGGGG 301 GAGACGGAGT CCACTGAGTT CCGTGTGTGG AATCCGTATC GCTCCAAGTT 351 GGCAGCTGCC ATTTATTCGG GTGTTGCTCA GATTTACATG GAGCCGGGTT 401 CCTCTGTGCT TTCCCTTGGA GCCGCCAGCG GAACCACCGT TAGTCATGTT 451 TCGGACCTGG TAGGACCAGA GGGTGTGTC TACGCGGTGG AATTTTCCCA 501 TCGCAGTGGC CGTGACTTGG AGGAGATGAC GAAGGCGCGA AACAAACATTG 551 TGCCCATCCT GGAAGATGCT CGCTATCCAC AGAAGTATCG CATGTTGATC 601 CCACGATTGG TGGATTGCAT CTTTATGGAT GTTGCCAGC CGGATCAGGC 651 ACGTATCTTG GCGCTGAACG CGCAACATTT TCTGAAGGAA AATGGCGGGT 701 TTGTCATATC TATCAAAGCC AACTGCATTG ATTCCACTGC GGATCCCGCC 751 ACAGTATTTG CCTCTGAAGT GCAGAACTA AAGGACTCCG GTCTGAGGCC 801 CAAGGAACAG GCCTCACTGG AGCCCTTTGA ACGTGATCAT GCCGTTGTTG 851 CAGGTACTA CAAGTGCCA CCGAAGTAA	Tc150Fibr: 307pb
Tm 68 °C		
Reverso		
Fib250R: 5' GCTTCGTCATCTCCTCCAAG 3'		
Tm 60°C		

**Tabla 2: Características de los oligonucleótidos usados en la reacción de PCR.** Los oligos fueron diseñados por la Dra. Fein y amplifican regiones internas de los genes de fibrilarina.

#### 4.3.2. Extracción de los productos amplificados por PCR

Los productos de las amplificaciones se corrieron por electroforesis en gel de agarosa 0.8% en TBE a 100 V por media hora, al termino, el gel fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml por 15 minutos, el gel se observó en un transiluminador UV, el tamaño de las bandas observadas fue estimado a partir del marcador TrackIt 1Kb DNA Ladder (Invitrogen), se comparó el tamaño de las bandas obtenidas con las esperadas y fueron recortadas del gel,

posteriormente, la región cortada se colocó en una columna de fibra de vidrio y se centrifugó a 6 Krpm por 5 min, el ADN se extrajo de la agarosa residual por medio de la adición de 1 volumen de la mezcla fenol:cloroformo 1:1 y finalmente con una segunda extracción volumen de cloroformo con dos centrifugaciones entre cada extracción de 5 min a 14 Krpm, recuperando la fase acuosa. Finalmente el ADN fue precipitado con 2 volúmenes de etanol absoluto y un décimo del volumen inicial de acetato de sodio 300mM, a una temperatura de -20°C durante toda la noche. Los tubos fueron centrifugados a 12 Krpm por 15 min, la pastilla fue lavada con etanol al 70% y disuelto en 50 µl de TE.

#### **4.3.3. Preparación de células competentes de *Escherichia coli* por SEM (Simple and Efficient Method)**

En una caja de Petri con agar LB se cultivaron células de *E.coli* (JM109, DH5α) y se pasaron las colonias durante 3 días. Después se tomó una de las colonias y se inoculó en medio YT2X con 30 µl de sales (MgCl<sub>2</sub> 1M y MgSO<sub>4</sub> 1M), estas células fueron incubadas por toda una noche a 37°C, posteriormente se tomaron 100 µl de inóculo y se colocaron en un matraz con 30 ml de YT2X y 300 µl de sales. El cultivo se incubó a temperatura ambiente y en agitación, cuando el cultivo llegó a una D.O.<sub>600</sub> de 0.6 se colocó el matraz en hielo durante 10 min, pasado este tiempo se centrifugó por 10 min a 3 Krpm a 4°C, el botón se resuspendió en 2.4 en TB con dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración final de 7% y se incubaron en hielo por 10 min. Finalmente se colocaron en tubos Eppendorf fríos de 200 µl y se congelaron inmediatamente sumergiéndolos en hielo seco con etanol. Para almacenar las células, se guardaron a -70°C.

#### **4.3.4. Clonación de productos amplificados en pGEM-T easy Vector y transformación de bacterias competentes.**

Las construcciones plasmídicas enfocadas al estudio de la transcripción de fibrilarina contienen secuencias de los pares de genes homólogos de fibrilarina del parásito, que fueron clonadas en pGEM-T Easy Vector (Promega), las

regiones clonadas son liberadas del vector con el uso de enzimas de restricción que realizan cortes en la región de multiclonación de pGEM, en este caso la enzima que libera el inserto clonado es *EcoRI*.

Para clonar los productos amplificados se colocó en un tubo Eppendorf, 5 µl de amortiguador 2x rapid ligation (Promega), 1 µl de pGEM-T easy Vector (50ng), 1 µl de los productos de PCR limpios (cada gen en tubo diferente), 1 µl de T4 ADN ligasa (Promega) y 2 µl Agua bidestilada. Los tubos fueron incubados toda una noche a 4°C.

Para transformar las células de *E. coli* competentes con los productos clonados se colocaron 2 µl de las construcciones plasmídicas junto con 50 µl de células competentes JM109 en 2 tubos Eppendorf estériles (un tubo para cada fracción de gen clonado) con una agitación suave por 50 seg a una temperatura de 42° C, inmediatamente se colocaron en hielo por 2 min y se le adicionaron 950 µl de medio SOC, los tubos se incubaron por 90 min a 37° C con agitación constante, después se tomaron 100µl, 300µl y 500µl de los cultivos y fueron espatulados en cajas de agar LB con ampicilina (100µg/ml), con el fin de seleccionar las bacterias transformadas, además, se les agregó IPTG (0.5 mM) y X-Gal (80µg/ml) que es usado para hacer mas fácil la selección de clonas, las cajas se incubaron por toda una noche a 37°C.

Al siguiente día se seleccionaron algunas clonas al azar (colonias blancas) y se crecieron en medio LB con ampicilina para determinar si las bacterias contenían el plásmido con los productos de las dos reacciones de PCR clonados.

#### **4.3.5. Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina (Minipreps)**

Después de la transformación de bacterias se llevó a cabo una extracción de ADN plasmídico con el fin de caracterizar las colonias que contienen la construcciones plasmídicas de interés, para esto se escogieron clonas al azar y se inocularon 3 ml de medio LB con ampicilina (100µg/ml) y se incubaron una

noche horas a 37°C. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a 14 Krpm durante 30 segundos, el sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 100 µl de solución de suspensión fría (glucosa 500mM, Tris-HCl a pH 8.0 25 mM y EDTA pH 8 10 mM) por 5 mins, después se agregaron 200 µl de solución de lisis recién hecha (NaOH 0.2N, SDS 1%), se mezcló por inversión 5 veces y se colocó en hielo, inmediatamente se adicionaron 150 µl de solución neutralizante fría (acetato de potasio 5M, ácido acético glacial al 10%), se mezcló por inversión durante 10 seg y se mantuvieron en hielo por 5 min, pasado el tiempo se centrifugó a 14 Krpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se realizaron 2 extracciones, la primera con un volumen de la mezcla fenol:cloroformo (1:1) y la segunda con un volumen de cloroformo, con dos centrifugaciones entre cada extracción de 5 min a 14 Krpm. El ADN plasmídico se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto a una temperatura de – 20°C por 20 mins, después se centrifugó por 10 min a 14 Krpm, el sobrenadante se retiró, el botón se lavó con etanol al 70% y se dejó secar por 2 min a temperatura ambiente, finalmente el ADN fue resuspendido en 50 µl de TE con ARNasa (Tris 10mM pH 7.4, EDTA 0.2 mM pH 7.2, ARNasa 20 µg/ml), las muestras se incubaron a 37 °C por una hora y almacenadas a -20°C.

#### **4.3.6. Digestiones enzimáticas en construcciones plasmídicas**

Los plásmidos extraídos se digirieron con enzimas de restricción con el fin de identificar las colonias que contenían, en su plásmido, un inserto de un tamaño igual a los productos amplificados por PCR.

En los ensayos que se requirieron digestiones, típicamente se cortaron 10 µg del plásmido con el fragmento clonado, y se le adicionaron 2 µl de enzima de restricción (dependiendo las secuencias que flanquean el inserto), y se llevó a un volumen final de 40 µl con agua bidestilada estéril, la incubación fue a 37°C por lo menos 5 horas. Por último se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al

0.8% en TBE, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ), finalmente observado con un transiluminador UV.

#### **4.3.7. Extracción de ADN plasmídico a mediana escala (Midipreps)**

Para obtener ADN plasmidico de mayor pureza de las clonas con el plásmido que liberan el inserto de tamaño esperado, se realizó una extracción a mediana escala (Midiprep) con el kit “QUIAGEN plasmid purification kit”.

Las bacterias transformadas fueron inoculadas en medio LB con ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$  e incubadas a 37° C por una noche, al día siguiente se centrifugaron a 6 Krpm por 15 mins a 4° C en rotor Sorvall SS34, el sobrenadante se eliminó por decantación, posteriormente se siguió la metodología del kit empleado, el cual, se basa en la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina y el uso de una columna de afinidad.

#### **4.3.8. Construcciones plasmídicas**

Se seleccionaron dos plásmidos, uno proveniente de la reacción de PCR para amplificar una región interna de los genes Tc00.104705351015.50/Tc00.1047053509715.40 y otro plásmido proveniente de la reacción de PCR que se uso para amplificar una región de los genes Tc00.1047053506211.250/Tc00.1047053511287.150. Se tomó una alícuota de cada plásmido y se llevó a una concentración de 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con un volumen total de 20  $\mu\text{l}$ . Las secuencias de estas alícuotas se obtuvieron con ayuda de la M. Sc. Patricia de la Torre que pertenece al Laboratorio No.7 del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (nueva cede), UNAM. Con el fin de corroborar que los insertos fueran de las regiones amplificadas en las reacciones de PCR para los dos pares de genes, a las secuencias recibidas se les realizó un algoritmo tipo “Blast”.

Los insertos fueron obtenidos después de digerir los plásmidos con *EcoRI* y purificados a partir de un gel de agarosa de la misma forma que fueron purificados los productos de PCR, una vez obtenido los insertos, fueron marcados radiactivamente y usados como sondas en los ensayos de *Southern blot* y *northern blot*. Las características de las construcciones plasmídicas se muestran en la siguiente tabla:

Plásmido	Características
pGEM-Tc50Fibr	<p><b>Vector:</b> pGEM-T easy Vector (3015 pb)</p> <p><b>Gen clonado:</b> Fragmento de los genes Tc00.104705351015.50 (100% idéntico) / Tc00.1047053509715.40 (99% idéntico) que codifican para la proteína de fibrilarina en <i>T. cruzi</i>, entre los nucleótidos 495 y 851 de la región codificadora.</p> <p><b>Inserto:</b> 356 pb que son liberados del vector con la enzima <i>EcoRI</i></p>
pGEM-Tc150Fibr	<p><b>Vector:</b> pGEM-T easy Vector (3015 pb)</p> <p><b>Gen clonado:</b> Fragmento de los genes Tc00.1047053506211.250 (97% idéntico) / Tc00.1047053511287.150 (99% idéntico) que codifican para la proteína de fibrilarina en <i>T. cruzi</i>, entre los nucleótidos 228 y 535 de la región codificadora.</p> <p><b>Inserto:</b> 307 pb que son liberados del vector con la enzima <i>EcoRI</i></p>

**Tabla 3: Características de las construcciones plasmídicas con fragmentos de los genes de fibrilarina**

#### 4.3.9. Preparación de sondas con marca radioactiva.

Las sondas empleadas en estudios de *Southern* y *northern blots* de nylon se elaboraron con el kit de marcaje “Amersham. Rediprime II Random Prime Labelling System” (GE Healthcare). Se emplearon 50 ng de ADN por cada sonda, dicho ADN fue desnaturalizado por calor (baño María a temperatura de ebullición de H<sub>2</sub>O por 5 mins) en 45 µl de amortiguador TE (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA), posteriormente se colocó en hielo por 5 mins, el ADN

desnaturalizado se adicionó en los respectivos tubos de reacción junto con 5  $\mu$ l de marca [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (20 $\mu$ Ci) y se incubaron a 37°C por 1 hora, la reacción se detuvo al agregarle 5  $\mu$ l de 0.2 M EDTA y se alcanzó un volumen final de 100 $\mu$ l con TE. La sonda se extrajo de la marca libre al hacerla pasar por una columna de Sephadex G-50. Finalmente se agregó a 10 ml de solución de hibridación (50% Formamida, 4X Denhardts, 0.2% SDS, 120 mM Amortiguador de fosfatos, SSC 2x, 2mM EDTA ph 8). Antes de su uso la sonda se calentó a temperatura de ebullición de agua por 10 mins y se colocó en hielo por 5 mins.

#### **4.4. Caracterización de fibrilarina en *T.cruzi* por ensayos de *Southern Blot* y *northern blot* de los genes de fibrilarina.**

##### **4.4.1. Experimentos tipo *Southern blot*.**

El ADN obtenido de epimastigotes de *T. cruzi* (3 $\mu$ g por carril) o ADN plasmídico (2 $\mu$ g por carril) fueron digeridos con endonucleasas de restricción, y los fragmentos de ADN resultantes se separaron por electroforesis en un gel horizontal de agarosa 0.8% en 1x de TBE. Las bandas de ADN fueron visualizadas después de teñir el gel con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio, en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta. El gel se enjuagó con agua desionizada y se colocó en solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5M) en agitación durante 50 min a temperatura ambiente, concurrido el tiempo se enjuagó nuevamente y se colocó en solución neutralizante (NaCl 1.5M, Triz-HCl 0.5M pH 7.5, EDTA 0.1mM) por 20 min, 2 veces, en agitación moderada. Posteriormente el ADN de los geles fueron transferidos a una membrana de nylon (Amersham Hybond-N, GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Terminada la transferencia el ADN, se fijó a la membrana por medio de radiación UV utilizando un Hoefer UV cross-linker (Hoefer Scientific Instruments) y se bloqueó la membrana con solución de hibridación (50% Formamida, 4X Denhardts, 0.2% SDS, 120 mM Amortiguador de fosfatos, SSC 2x, 2mM EDTA ph 8) a 42°C durante 2h. Las membranas fueron hibridadas con la sonda marcada radiactivamente diluida en solución de hibridación a 42°C por 24h.



Después de este tiempo las membranas fueron lavadas con una solución de SSC 0.2x y SDS 0.1% durante 30 mins, 3 veces, entre cada lavado fueron enjuagadas con una solución de SSC 0.2x, por último las membranas fueron expuestas en pantalla radiográfica (Kodak X Omat Ar Film) por 3 días y reveladas en cuarto oscuro. Por otra parte estas membranas también fueron expuestas a una pantalla FX (FUJI) la imagen resultante fue capturada y digitalizada después de 24h de exposición con el sistema Molecular Imagen (BioRad). El tamaño de los fragmentos de digestión fue estimado en base a los marcadores usados (Lambda *Hind*III Ladder de Biolabs) y la cuantificación de las señales fue hecho con el software Quantity One (BioRad).

#### **4.4.2 Experimentos tipo *northern blot***

Se preparó un gel fundiendo 1 mg de agarosa en 73 ml de agua tratada con DEPC en el horno de microondas, se dejó enfriar lo suficiente para poder agregar 10 ml de amortiguador MOPS/EDTA 10x y 16.2 ml de Formaldehído 37%, se agitó suavemente para homogenizar y se vació en cámara de electroforesis (Pelle y Murphy, 1993). Se dejó gelificar a temperatura ambiente por 1 h, el amortiguador de corrida usado fue MOPS/EDTA 1x. Sistemáticamente se cargó por carril 7 µg de ARN total en cada ensayo. El gel se pre-corrió a 60 V por 3 min y una vez cargadas las muestras se corrieron a 70 V / 4.5 h. Posteriormente el ARN del gel fue transferido a una membrana de nylon (Amersham Hybond-N, GE Healthcare) y fijado mediante radiación UV, dicha membrana fue bloqueada con solución de hibridación sin sonda, posteriormente hibridada con la sonda radiactiva por 24h a 42°C, lavadas 3 veces con solución de lavado (SSC 0.2x , SDS 0.1%), con 3 enjuagues (SSC 0.2x) y finalmente expuestas en pantalla radiográfica y pantalla FX. El control de tamaños de los fragmentos hibridados fueron estimados a partir de los marcadores de tamaño de ARN usados (0.1-2 Kb ARN Ladder y 0.5-10Kb Ladder, Invitrogen).

#### **4.4.3. Control de carga y niveles ARNm de fibrilarina**

La cuantificación relativa del ARNm de fibrilarina en los ensayos *northern blot*, se llevó a cabo mediante el uso de la sonda pRTC 32 que proporciona una señal a 1.6 Kb correspondiente al ARNr 24S $\beta$  (Ver Introducción Fig. 6, Hernández et al, 1988; Cevallos et al, 2005). Se ha descrito que la cantidad de ARNr depende de la carga de ARNr total por carril y es evidente en geles de electroforesis teñidos con bromuro de etidio. Al tener una señal radiactiva cuantificable de hibridación en los ARNr, es posible obtener la cantidad relativa de cualquier transcrito con la relación: ARNm/ARNr.

Con el sistema Molecular Imager FX (BioRad) y el programa computacional Quantity One (BioRad) se cuantificó la radiactividad de las señales en los filtros hibridados con las sondas de fibrilarina en los ensayos *northern blot*, posteriormente se les retiró la marca con 3 lavados en la solución EDTA 10mM a pH 7.2, SDS 0.1% a temperatura de ebullición, al final las membranas se secaron a temperatura ambiente. Las condiciones del ensayo de *northern blot* con la sonda pRTC32 fueron las mismas que en los ensayos anteriores. Nuevamente la cantidad de radiactividad en las señales de hibridación con la sonda pRTC 32 se obtuvieron con el sistema Molecular Imager FX (BioRad). Los niveles de transcritos de fibrilarina se obtuvieron con la relación: Cantidad de radiactividad de ARNm de fibrilarina / Cantidad de radiactividad de RNAr 24S $\beta$ . El cociente con mayor valor fue normalizado a 100% y bajo este criterio se obtuvieron los porcentajes relativos de los otras hibridaciones.

#### **4.5. Herramientas bioinformáticas:**

##### **4.5.1. Alineamientos, Patrón de restricción y Blast:**

Los alineamientos de las secuencias a nivel de nucleótidos y aminoácidos de los alelos de fibrilarina fueron hechos con el programa computacional ClustalW

disponible en la página: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (EBI 2010) y DNAMAN (Lynnon BioSoft 1996).

Los sitios de restricción en los contig obtenidos (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), fueron analizados con el programa DNAMAN, el patrón de restricción derivado de las digestiones se editó con el programa Adobe PhotoShop Cs.

Los algoritmos Blast que se realizaron a las secuencias de los plásmidos pGEM-Tc50Fibr y pGEM-T150Fibr fueron hechos en la página de NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Este algoritmo compara la secuencia ingresada (Query) con los genes anotados del genoma de *T. cruzi*. el resultado indica el nombre del gen con el que mayor similitud existe (Sbjct), también representa el alineamiento y cambios puntuales de nucleótidos de las dos secuencias (Query y Sbjct).

#### **4.5.2. Modelaje molecular:**

Para modelar las probables estructuras terciarias de los genes de fibrilarina de *T. cruzi* se utilizó el programa computacional en línea Phyre que se encuentra disponible en la página: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre> (Kelley y Sternberg, 2009). Los modelos producidos por este programa se basan en un alineamiento de secuencias generado por un algoritmo PSI Blast, entre las fibrilarinas y estructuras conocidas, el programa copia las coordenadas e inserta los residuos basados en las secuencias de aminoácidos de los genes Fib 50 y Fib 250. La edición de los archivos cristalográficos (PDBs) obtenidos, se realizó en el programa computacional PyMOL (Lyford, 2006).

## 5. Resultados.

### 5.1. Obtención de sondas específicas de los genes de fibrilarina

En primer lugar a cada uno de los alelos que codifican para fibrilarina encontrada en el proyecto genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) se les asignó una clave que los diferencia fácilmente uno de los otros. Para asignar la clave, a cada gen de fibrilarina se antepuso la contracción “Fib”, seguido por los últimos números después del último punto de la clave de acceso (ID) anotada en la base de datos. Esta clave fue usada para reportar todos los resultados de los ensayos experimentales y discusiones del presente trabajo de tesis, por lo que el alelo con ID: Tc00.1047053509715.40 se identificó con la clave Fib 40, al alelo con ID Tc00.104705351015.50 se identificó con la clave Fib 50, al alelo con ID Tc00.1047053506211.250 se identificó con la clave Fib 250 y por último al alelo con ID Tc00.1047053511287.150 se le identificó con la clave Fib 150.

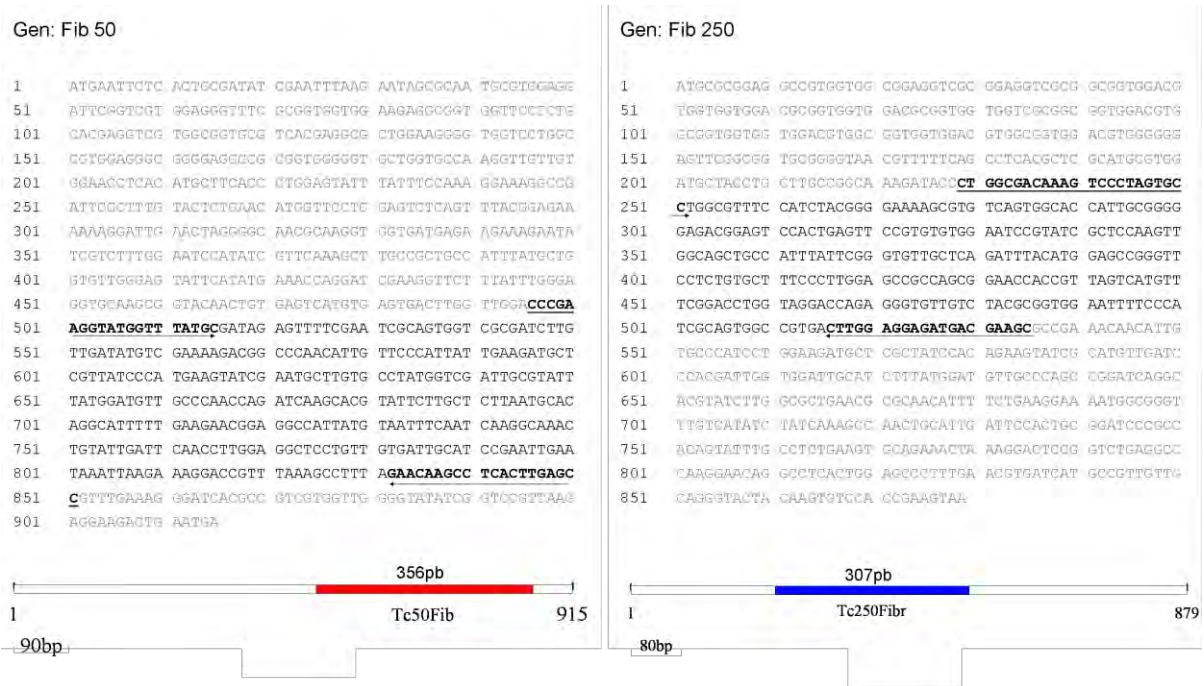
Para la obtención de las sondas homólogas de los genes, fue necesario realizar el alineamiento de los 4 alelos de fibrilarina en el programa ClustalW2 (Anexo Ia), con el fin de conocer el porcentaje de similitud, identificar homologías en secuencia entre ellos e identificar regiones que pudieran servir de molde para el diseño de los oligonucleótidos iniciadores específicos para cada gen.

En general, la mayoría de las proteínas que se expresan en *T. cruzi* CL Brener se encuentran codificadas por al menos un par de copias alélicas esto debido a la naturaleza diploide del genoma de la cepa (El-Sayed et al. 2005), al finalizar el análisis bioinformático se identificaron como genes homólogos a los alelos Fib 40 y Fib 50 debido que presentan 99% de similitud en secuencia entre ellos, de la misma forma a los genes Fib 150 y Fib 250 que presentan 96% de similitud en secuencia (Tabla 3), entre estos pares la similitud alcanza un 63 a 65% a nivel de secuencia de nucleótidos y aminoácidos.

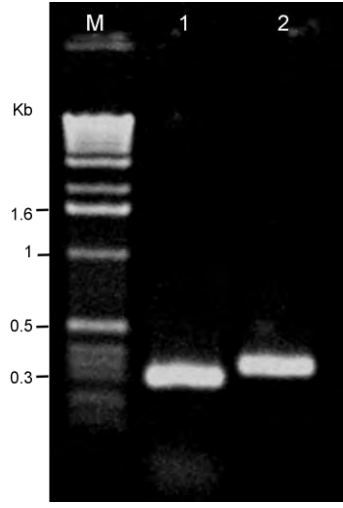
	Fib 40		Fib 50		Fib 150		Fib 250	
	Nt	aa	Nt	aa	nt	aa	nt	aa
<b>Fib 40</b>	100%		99%	99%	63%	65%	63%	64%
<b>Fib 50</b>			100%		64%	64%	64%	64%
<b>Fib 150</b>					100%		96%	96%
<b>Fib 250</b>							100%	

**Tabla 4. Porcentaje de similitud en secuencia en los alelos de fibrilarina.** Después del alineamiento de los alelos con el programa ClustalW2, se obtuvo el porcentaje de similitud a nivel de secuencia de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa), entre cada uno de los genes de fibrilarina.

Con el fin de simplificar el análisis bioinformático entre los 4 alelos, se utilizaron las secuencias de los genes Fib 50 y Fib 250 (Fig. 10) como representación de cada par de alelos en el diseño de los oligonucleótidos iniciadores. Los oligonucleótidos nombrados como Fib50F y Fib50R se utilizaron en la reacción de PCR para amplificar una región interna del gen Fib 50 que comprende desde el nucleótido 495 hasta 851, el producto de la amplificación esperado fue de 356 pb (Tc50Fibr). Los oligonucleótidos nombrados como Fib250F y Fib250R se utilizaron en la amplificación de la región interna del gen Fib 250 entre los nucleótidos 228 y 235, el producto de la amplificación esperado fue de 307 pb (Tc250Fibr).



**Fig. 10** Secuencias de los genes *Fib50* y *Fib250* de *Trypanosoma cruzi*. Las regiones subrayadas indican las secuencias usadas como molde para diseñar los oligonucleótidos iniciadores en las reacciones de PCR; debajo de cada secuencia, se muestra esquemáticamente los amplicones de cada gen (rojo: Tc50Fibr y azul: Tc250Fibr).

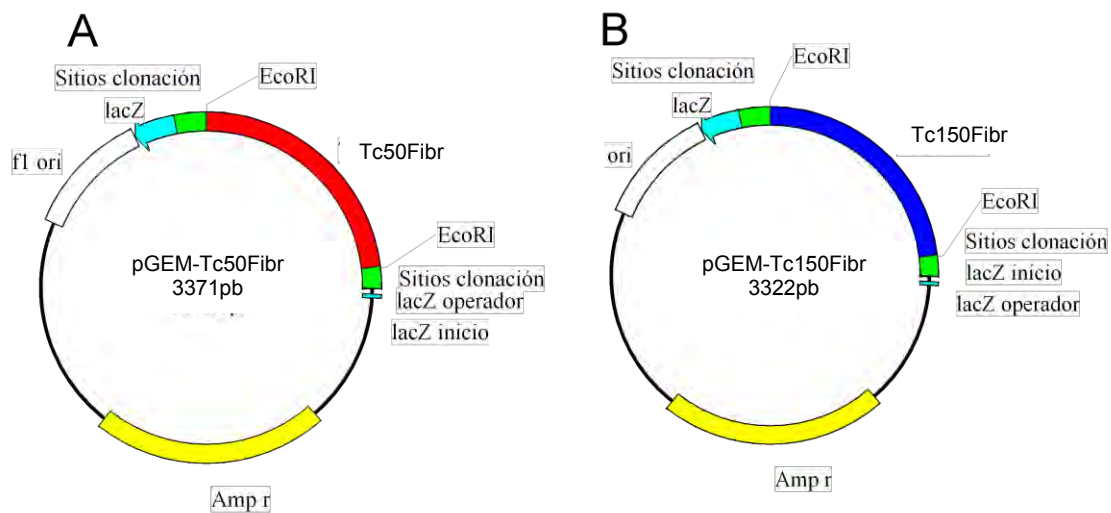


**Fig. 11** Productos de la reacción de PCR. A partir de ADN genómico digerido con *EcoRI* se realizó la reacción de PCR con los oligonucleótidos específicos para cada par de genes de fibrilarina. En el carril 1 se muestra el producto Tc250Fibr (~307 pb), y en el carril 2 el producto Tc50Fibr, (~356 pb). El marcador de tamaño corresponde a TrackIt 1 Kb DNA Ladder, Invitrogen (M).

La reacción de PCR se llevó a cabo a partir de ADN genómico digerido con *EcoRI*. En la elección de la enzima se consideró que esta no cortara la región del gen que se deseaba amplificar. Los productos obtenidos después de la reacción de PCR fueron corridos por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y posteriormente de tratar el gel con bromuro de etidio y colocarlo en el transiluminador de luz UV, el tamaño de los productos se evidenciaron (Fig. 11).

Los productos de la amplificación se extrajeron del gel por medio de una centrifugación en columna de fibra de vidrio y extracciones fenol:cloroformo, la fase acuosa recuperada se le adicionó etanol absoluto, para promover la precipitación de los productos de PCR (Amplicones: Tc50Fibr y Tc250Fibr), se eliminó el etanol y los pastillas fueron resuspendidas en amortiguador TE. Los amplicones Tc50Fibr y Tc250Fibr extraídos, se clonaron en pGEM-T easy Vector, enseguida se realizó la transformación de bacterias competentes *E.coli* (JM109, DH5 $\alpha$ ) por choque térmico. Las bacterias fueron incubadas y espatuladas en cajas de agar LB con ampicilina (100 $\mu$ g/ml), con el fin de seleccionar las bacterias transformadas, además se les agregó IPTG (0.5 mM) y X-Gal (80 $\mu$ g/ml) que es usado para hacer más fácil la selección de clones que tienen no solo el plásmido (colonias azules) sino también inserto (colonias blancas), las cajas se incubaron por toda una noche a 37°C. Se escogieron varias colonias blancas al azar y se les extrajo el ADN plasmídico por lisis alcalina (miniprep). El ADN plasmídico de los minipreps se digirió con *EcoRI* y por electroforesis en gel de agarosa se comparó el tamaño de los insertos clonados con los amplicones Tc50Fibr y Tc250Fibr. Se escogieron 2 clones con insertos del mismo tamaño a los amplicones y se les realizó una extracción plasmídica a media escala (midiprep) con el kit QUIAGEN plasmid purification kit, una alícuota de cada purificación fue procesada para obtener la secuencia de los insertos. Las secuencias recibidas se compararon con todo el genoma del parásito por medio de un algoritmo "Blast" en la página: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, el resultado de esta comparación reveló que la secuencia de Tc50Fibr tiene una identidad de un 100% con la secuencia anotada del gen Fib 50 y un 99% de identidad al compararse con la secuencia anotada del gen Fib 40 (Anexo IIa).

Por otra parte la secuencia del inserto Tc250Fibr tiene una identidad de un 99% con la secuencia anotada del gen Fib 150 y un 97% de identidad al comparar la secuencia anotada con el gen Fib 250 (Anexo IIb). Los plásmidos con los insertos gene-específicos fueron nombrados y clasificados como pGEM-Tc50Fibr y pGEM-Tc150Fibr debido a que los insertos tienen mayor similitud con los genes anotados como Fib 50 y Fib 150 respectivamente (Fig. 12, Ver: Tabla 3 en Material y Métodos). Los insertos Tc50Fibr y Tc150Fibr, liberados de los plásmidos con la enzima *EcoRI* (Fig. 13A), se purificaron, posteriormente marcados radiactivamente con el kit Amersham. Rediprime II Random Prime Labelling System para ser usados como sondas en experimentos de hibridación tipo *Southern blot* y *northern blot*.



**Fig. 12 Plásmidos pGEM-Tc50Fibr y pGEM-Tc150Fibr.** Los plásmidos se construyeron a partir del Vector pGEM-T Easy (3015pb). (A) El plásmido pGEM-Tc50Fibr contiene el inserto Tc50Fibr de 356pb (rojo). (B) El plásmido pGEM-Tc150Fibr contiene el inserto Tc150Fibr de 307pb (azul marino). Los fragmentos se encuentran dentro de la región múltiple de clonación (verde) y son flanqueados por sitios de restricción *EcoRI*.

Uno de los objetivos marcados en este trabajo comprende la caracterización específica de los genes de fibrilarina, por lo que fue necesario comprobar la especificidad de las sondas obtenidas, descartando alguna probable hibridación cruzada.

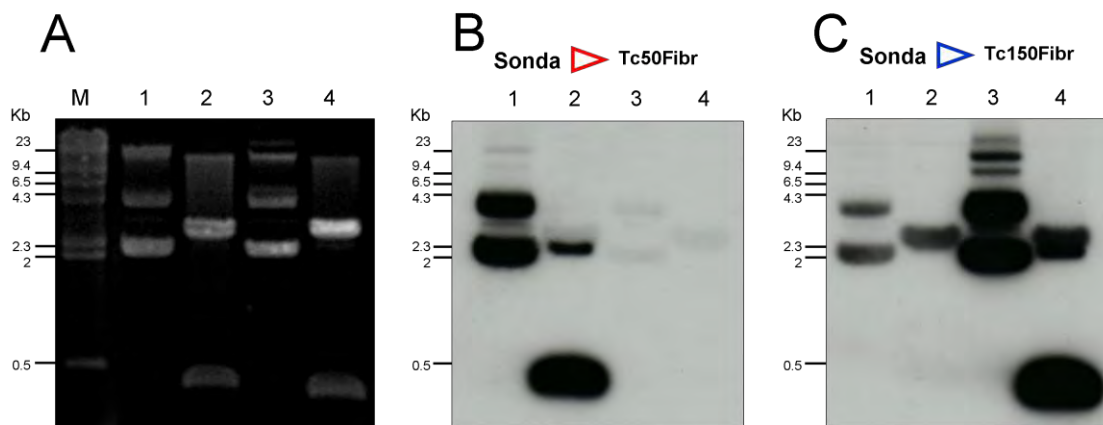


## 5.2. Ensayos de hibridación cruzada para las sondas gene-específicas

### 5.2.1. Ensayo de hibridación cruzada entre sondas: Tc50Fibr y Tc150Fibr, y los plásmidos: pGEM-Tc50Fibr y pGEM- Tc150 Fibr.

El primer ensayo fue dirigido para descartar la probable hibridación entre la sonda Tc50Fibr y la sonda Tc150Fibr, aunque al alinear las sondas el porcentaje de identidad obtenido fue relativamente bajo: 16% (Anexo IIIc).

En 8 carriles de un gel de agarosa al 0.8% se corrieron por electroforesis los plásmidos pGEM-Tc50Fibr y pGEM-Tc150Fibr superenrollados y digeridos con *EcoRI*, (Fig. 13 A), posteriormente el ADN separado por tamaño se transfirió y fijó a 2 membranas de nylon, cada filtro se hibridó por separado con las sondas Tc50Fibr y Tc150 Fibr por toda una noche, pasado este tiempo, los filtros se lavaron para retirar la marca libre. La exposición en placa radiográfica de los filtros fue de 1 hora, posteriormente las placas radiográficas se revelaron. En las placas se observó que no había reconocimiento de la sonda Tc50Fibr por el inserto Tc150Fibr liberado del vector, de la misma forma la sonda Tc150Fibr no reconoció al inserto Tc50Fibr liberado del vector, solamente hubo señal de hibridación en las regiones del filtro que se encontraba el inserto del que provenían las sondas y donde se encontraba el vector (Fig. 13 B y C).



**Fig.13 Ensayo de hibridación cruzada entre las sondas de fibrilarina y los plásmidos pGEM-Tc50Fibr y pGEM- Tc150** (A) Patrón teñido con bromuro de etidio de los plásmidos pGEM-Tc50Fibr y pGEM-Tc150Fibr en forma superenrollada (carriles 1 y 3 respectivamente), y digeridos con *EcoRI* (carriles 2 y 4,

respectivamente) corridos por electroforesis en gel de agarosa (ensayo por duplicado, 8 carriles en total) y transferidos a membrana de nylon para realizar ensayos tipo Southern blot. **(B)** Hibridación de las construcciones plasmídicas con la sonda Tc50Fibr. **(C)** Hibridación de las construcciones plasmídicas con la sonda Tc150Fibr. Como marcador de tamaño se uso Lambda *HindIII* Ladder (M)

### **5.2.2. Ensayo de hibridación gene-específica con las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr.**

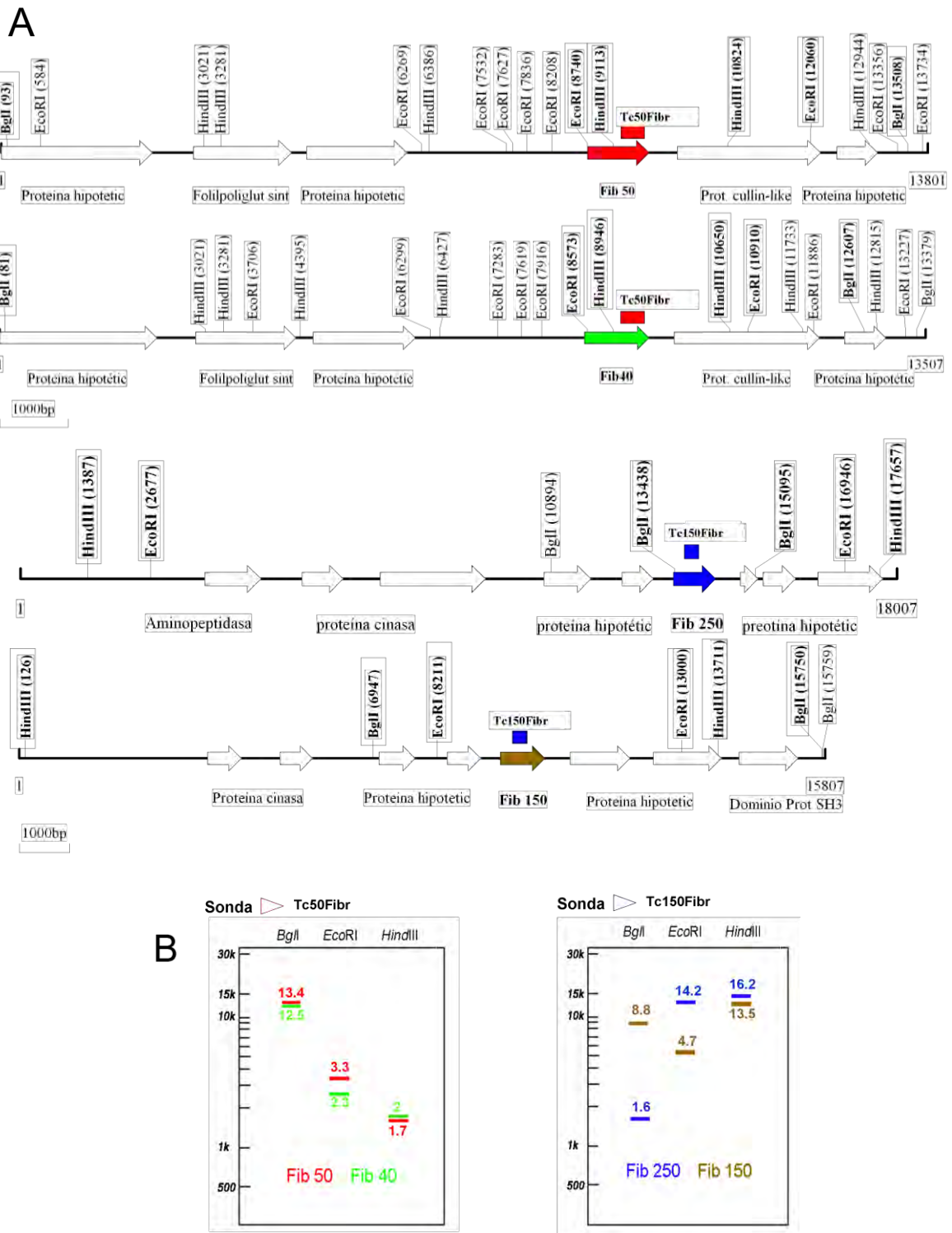
Para determinar si la sonda Tc50Fibr hibridaba específicamente con los genes Fib 40 y Fib 50, y la sonda Tc150Fibr hibridaba específicamente con los genes Fib 150 y Fib 250, se diseñó un ensayo de hibridación teórico en el cual el patrón de hibridación esperado resultara diferente para cada uno de los genes.

Los contextos genómicos (contig) de cada uno de los alelos de fibrilarina utilizado, se obtuvieron de la base de datos de <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>. La localización cromosómica de los contig son: gen Fib 40: TcChr4-P:86000,99500; gen Fib 50: TcChr4-S:86000,99800; gen Fib 150: TcChr40-P:457700,473500; gen Fib 250: TcChr40-S:454000,472000. Con el programa computacional DNAMAN se determinó el sitio de corte por diversas endonucleasas en la secuencia obtenida de cada contig. Los aspectos que considerados en las enzimas de restricción fueron: 1) No cortar la secuencia del alelo donde la sonda hibrida, 2) Los fragmentos de ADN donde se encontraban los alelos fueran de distintos tamaños. Las enzimas *BglI*, *EcoRI* y *HindIII* cubrían los aspectos requeridos para el análisis. El mapa de restricción de los contigs de esquematiza en la Fig. 14 A. Se analizaron los tamaños de los fragmentos de ADN esperados de cada digestión, se representó gráficamente el patrón teórico de señales de hibridación entre las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr, y los fragmentos de ADN separados. El diagrama teórico de las señales de hibridación en los filtros se realizó con DNAMAN y Adobe PhotoShop Cs (Fig 14 B).

Después obtener el patrón teórico de hibridación, se realizó la digestión de ADN genómico extraído de un cultivo de epimastigotes en fase logarítmica tardía ( $30 \times 10^6$  cel/ml) con las enzimas *BglI*, *EcoRI* y *HindIII*. Electroforéticamente se

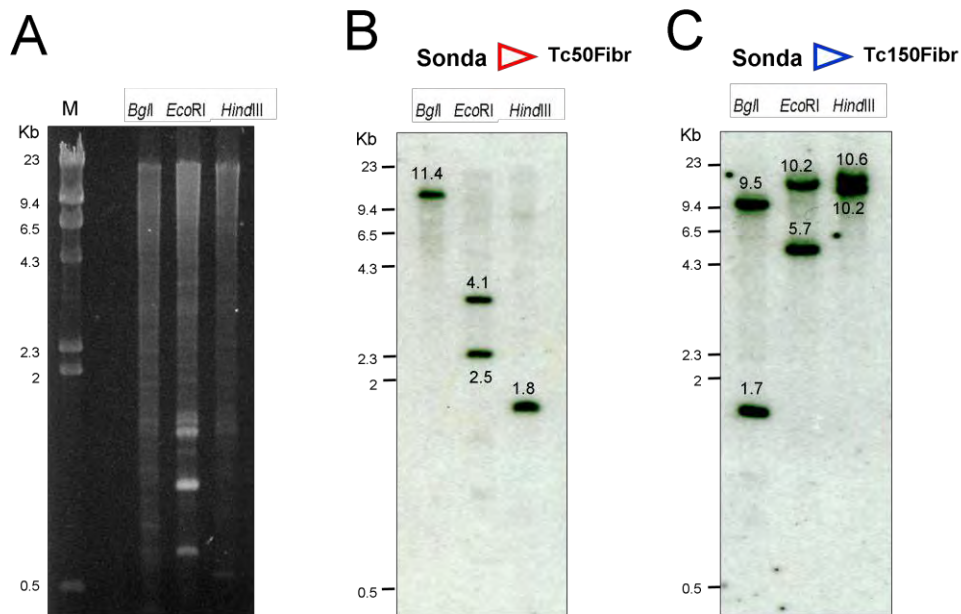
separaron los fragmentos de ADN, posteriormente se transfirieron a 2 membranas (3 digestiones con cada enzima por membrana; Fig.15 A) y se fijó por medio de radiación UV.

Cada filtro se hibridó por separado con las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr marcadas radiactivamente por toda una noche y después de los lavados se expusieron por 20 días en una placa radiográfica. El patrón de las señales de hibridación se hizo evidente después del revelado de la placa (Fig. 15 B).



**Fig. 14 Mapa de sitios de restricción.** (A) Con ayuda del programa DNAMAN se obtuvieron los sitios de restricción *BglII*, *EcoRI* y *HindIII*, de los contextos genómicos (contig) de los 4 alelos de fibrilarina obtenidos de la base de datos: <http://tritypdb.org/tritypdb/>, las flechas representan los genes encontrados en las secuencias utilizadas, en rojo tenemos el gen *Fib 50*, en verde el gen *Fib 40*, en azul el gen *Fib 250* y en dorado el gen *Fib 150*. Los sitios enmarcados flanquean las regiones donde se alinean las sondas Tc50Fibr (rectángulo rojo) y Tc150Fibr con los alelos (rectángulo azul) (B) Diagrama teórico hecho en el programa computacional DNAMAN de las hibridaciones entre las sondas gene-específicas de fibrilarina y ADN digerido

con las enzimas *Bgl*I, *Eco*RI y *Hind*III. El tamaño de los fragmentos donde se realiza la hibridación es marcado.



**Fig.15 Hibridación gene-específica de los alelos de fibrilarina con las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr.**

(A) El ADN extraído de epimastigotes fue digerido con las enzimas *Bgl*I, *Eco*RI y *Hind*III, los fragmentos fueron separados en tamaños por electroforesis en agarosa (las digestiones se hicieron por duplicado, 6 carriles en total). El ADN digerido separado electroforeticamente se transfirió a membranas de nylon para realizar los ensayos de hibridación tipo Southern blot. (B) Hibridación entre el ADN digerido y la sonda Tc50Fibr (C) Hibridación entre el ADN digerido y la sonda Tc150Fibr. Los tamaños de los fragmentos digeridos donde se llevó a cabo la hibridación son marcados. La aparición de dos bandas por carril indica la separación de los alelos por medio de las digestiones. Como marcador de tamaño se usó Lambda *Hind*III Ladder, Biolabs (M).

### 5.3. Ensayo de hibridación con los transcritos de fibrilarina utilizando las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr durante el crecimiento de *T. cruzi*.

Para determinar la presencia y comportamiento del ARNm de fibrilarina durante el crecimiento de epimastigotes en medio LIT, se realizó un ensayo tipo *northern blot* con la extracción del ARN total con Trizol a 4 cultivos paralelos en diferentes días de incubación dentro de la curva de crecimiento. La cantidad de parásitos presentes en los cultivos se monitoreó mediante conteo de células en cámara Neubauer en los días: 1, 4, 7, 11, 16, 20 y 23 días de incubación (Fig 16B), en la Tabla 5 se muestra la densidad de parásitos en los días donde se llevo la cuenta.

La extracción de ARN total del cultivo de epimastigotes en fase logarítmica temprana se realizó a los 4 días de incubación. La extracción de ARN total en del segundo cultivo en fase estacionaria temprana se realizó a los 11 días de incubación. El ARN total proveniente de la población en fase estacionaria tardía se realizó a los 20 días de incubación. La última extracción de ARN total fue enfocada a analizar la recuperación en los niveles de transcripción de los genes de fibrilarina, a partir de un cultivo en fase estacionaria tardía (20 días de incubación), se realizó una dilución en 5 frascos con medio LIT nuevo a una concentración final de  $1 \times 10^6$  cel/ml y después de 3 días de incubación (día 23) se realizó la extracción de ARN total (Tabla 5).

		Densidad de parásitos ( $10^6$ cel/ml)					Promedio	ARNtot ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
Cultivo:		1	2	3	4			
Días de incubación	0	1	1	1	1		1.00	
	4	9.75	9	8.75	9		9.13	3.11
	7		49.25	54.5	49.75		51.17	
	11		74.25	80.25	82.5		79.00	2.05
	16			75.25	80.25		77.75	
	20			74.25	76		75.13	1.54
	Dilución (4)	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5		
	20	1	1	1	1	1	1.00	
	23	1.75	1.5	1	1.25	1	1.38	1.00

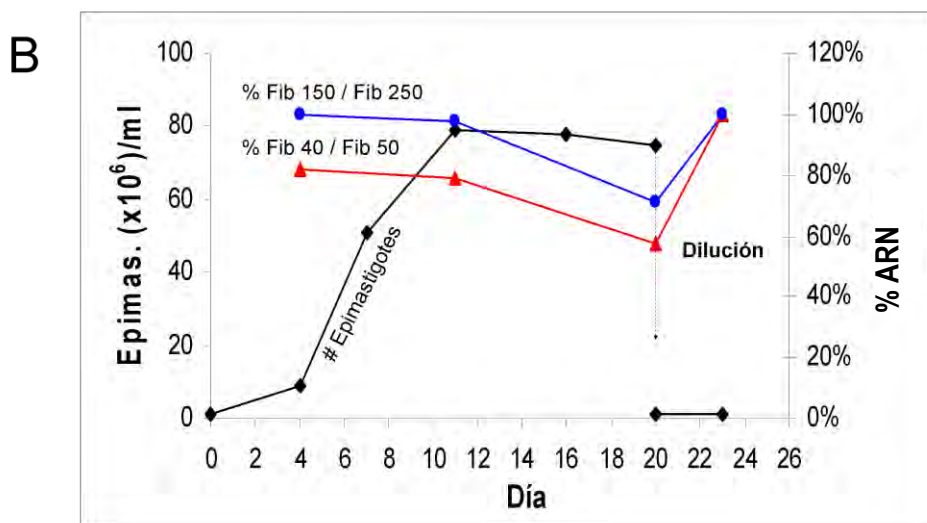
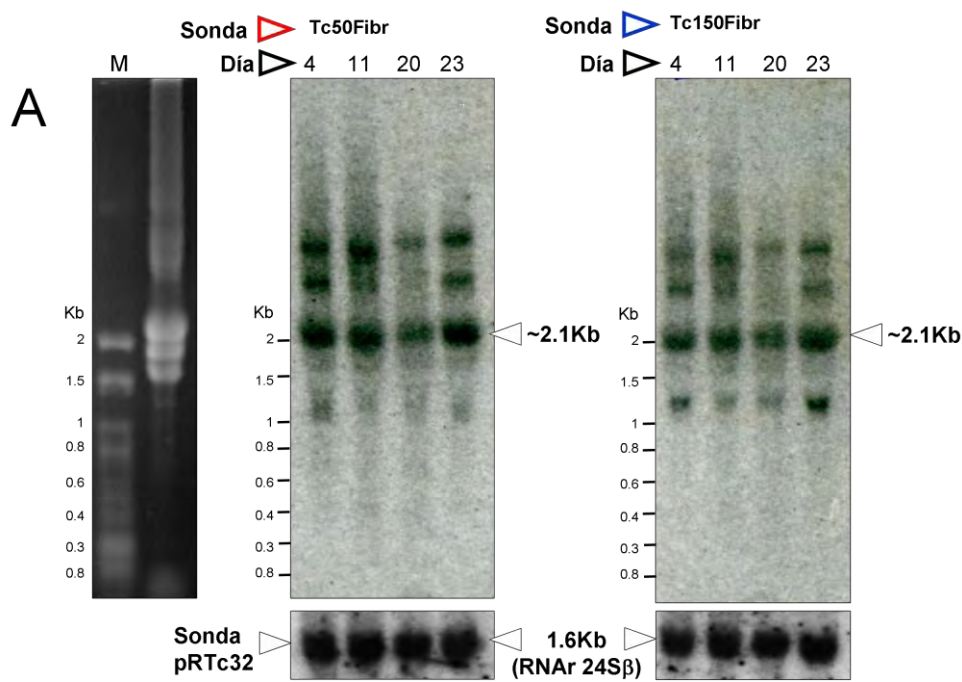
**Tabla 5. Cantidad de parásitos por mililitro en diferentes días de incubación y concentración de ARN total extraído.** En la tabla se muestra la cuenta de parásitos en cámara Neubauer de los cultivos utilizados en la extracción de ARN total, con asterisco se señalan el día en que se llevo a cabo la extracción de ARN total. Se reporta concentración del material ribonucleico extraído.

La cantidad de ARN total que se cargó por cada carril en el gel desnaturizante de agarosa 1% fue de 7  $\mu\text{g}$ , se corrió electroforéticamente, posteriormente el material fue transferido a 2 membranas de nylon (4 carriles por filtro correspondientes a cada una de las extracciones ARN total en la curva de crecimiento), y se realizó la hibridación con las sondas marcadas radiactivamente Tc50Fibr y Tc150Fibr por separado, después de los lavados se expusieron en placa radiográfica. El comportamiento del transcrito se hizo evidente después de revelar dichas placas (Fig 16A).

En las 2 hibridaciones se hizo evidente dos transcritos correspondientes a los dos genes de fibrilarina de aproximadamente 2.1Kb que durante el crecimiento del parásito baja la cantidad de transcrito aparentemente, el nivel de transcrito aumenta a niveles comparables con los iniciales después de inocular los epimastigotes envejecidos en medios LIT frescos. La intensidad de señal fue detectada con pantalla FX y cuantificada con el programa computacional Quantity One de BioRad.

La cuantificación relativa del ARNm de fibrilarina en los ensayos *northern blot*, se llevó a cabo mediante el uso de la sonda pRTC 32 que proporciona una señal a 1.6 Kb correspondiente al ARNr 24S $\beta$  (Fig. 16A). La intensidad de señal fue cuantificada de la misma forma que los transcritos de fibrilarina y se obtuvo el nivel relativo de los transcritos de fibrilarina ajustado la con la carga de ARNr por carril utilizando la relación: ARNm fibrilarina / ARNr. La relación con el valor numérico más alto fue normalizada como 100% en cada ensayo de hibridación (Fig 16B).

Los niveles de ARNm de fibrilarina normalizados, indican una disminución pequeña en cultivos viejos de epimastigotes donde la célula ha dejado de dividirse, al parecer la cantidad de transcrito presente recupera los niveles iniciales, cuando las células son colocadas en las condiciones óptimas de proliferación.



**Fig. 16 Porcentaje de ARNm de fibrilarina durante el crecimiento de epimastigotes.** (A) Se extrajo ARN total de cultivos de epimastigotes con 4, 11, 20 y 23 días de crecimiento. El cultivo con 23 días corresponde a una dilución a partir del cultivo con 20 días en medio fresco. El ARN total integro, se corrió en gel de agarosa y se transfirió a membranas de nylon para realizar ensayos de *northern blot* con las sondas gene-específicas de fibrilarina. El tamaño determinado del ARNm de fibrilarina en las dos hibridaciones fue de ~2.1Kb. Como control de carga se usó la sonda pRTc32 que muestra una señal de 1.6 Kb correspondiente al ARNr 24Sβ. (B) El número de parásitos se gráfico con respecto al tiempo de cultivo (♦). Los niveles de ARNm de fibrilarina se obtuvieron a partir de la relación ARNm de Fib / ARNr 24Sβ de las cantidades de marca radiactiva por tiempo. Los valores se graficaron en porcentaje (eje secundario) con respecto al tiempo del cultivo, la relación con mayor valor en la relación obtenida entre el transcrito y ARNr ribosomal se normalizó a 100%. (▲ Nivel de ARNm Fib 40 / Fib50; ● Nivel de ARNm Fib 150 / Fib 250).



#### 5.4. Ensayo de hibridación con los transcritos de fibrilarina utilizando las sondas Tc50Fibr y Tc250Fibr en poblaciones diferenciadas de *T. cruzi*.

Para caracterizar el ARNm de fibrilarina en estadios proliferativos y no proliferativos de epimastigotes, primero se extrajo el ARN total con Trizol de 3 cultivos de *T. cruzi*. La primera extracción se realizó a partir de un cultivo de epimastigotes en fase de crecimiento exponencial (Fig. 17A), el segundo de epimastigotes en fase estacionaria, donde las células han dejado de multiplicarse, y por último un cultivo enriquecido con tripomastigotes metacíclicos (Fig. 17A). Estas formas no replicativas se obtuvieron al inocular epimastigotes de fase logarítmica en medio M-16 (ver Material y métodos). Este medio es bajo en nutrientes e imita las condiciones que existen en la orina del triatomino induciendo la diferenciación por estrés nutricional. Aunque no todas las células presentes en el medio se diferencian experimentalmente se ha observado que más del 50% de la cuenta total de parásitos se identifican como tripomastigotes metacíclicos. La cuenta de parásitos en cámara Neubauer se reporta en la siguiente tabla:

		Días de incubación	Densidad de parásitos (10 <sup>6</sup> cel/ml)	ARNtot (µg/µl)	Rendimiento de ARN por célula (10 <sup>-7</sup> µgRNA/cel)
Cultivo	Epimastigotes de Fase logarítmica (F log)	4	9.75	2.92	9.83
	Epimastigotes de Fase estacionaria (F est)	12	78.75	2.84	1.20
	Cultivos enriquecido en tripomastigotes metacíclicos (Meta)	9*	37	1.75	1.57

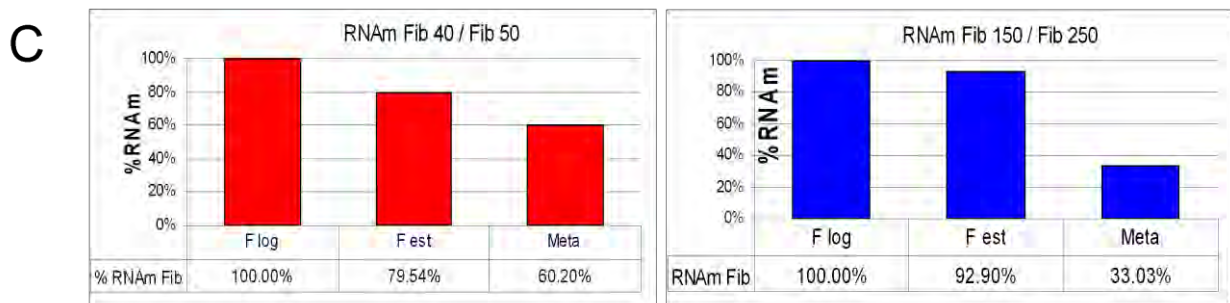
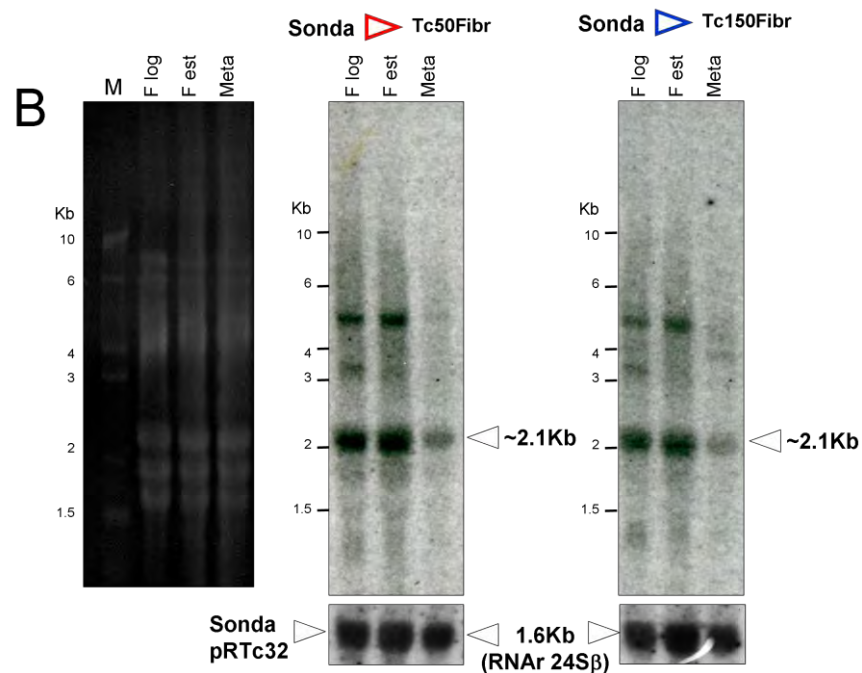
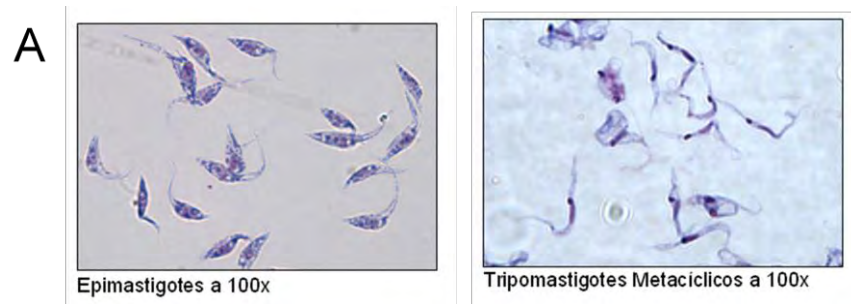
**Tabla 6. Cantidad de parásitos por mililitro y concentración de ARN total extraído de parásitos diferenciados.** En la tabla se muestra la cuenta de parásitos en cámara Neubauer de los cultivos utilizados en la extracción de ARN total, se señala los días de incubación en medio M-16 de epimastigotes (\*), día en que se llevó a cabo la extracción de ARN total. Se reporta concentración del material ribonucleico extraído.

Se cargó 7 µg de ARN total por cada carril en el gel desnaturante de agarosa 1%, se corrió electroforéticamente, posteriormente el material fue transferido a 2 membranas de nylon (3 carriles por filtro correspondientes al ARN total extraído de los diferentes estadios), y se realizó la hibridación con las sondas marcadas

radiactivamente Tc50Fibr y Tc150Fibr por separado, después de los lavados se expusieron en placa radiográfica. Después de revelar dichas placas se analizó el comportamiento del transcrito en las diferentes poblaciones (Fig 17B).

En esta hibridación se confirmó la presencia de los transcritos de fibrilarina de ~2.1Kb que se hicieron evidentes en los ensayos de la curva crecimiento, en este ensayo prevalece la pequeña disminución de los transcritos de fibrilarina en fase estacionaria. En cultivos enriquecidos con estadios metacíclicos se observa una disminución más evidente en los dos mensajeros de fibrilarina. Para corroborar esta tendencia se obtuvo la cantidad relativa de transcrito con pantalla FX, cuantificada con el programa computacional Quatity One de BioRad.

Nuevamente se utilizó la sonda pRTC 32, la intensidad de señal correspondiente al ARNr 24S $\beta$  fue cuantificada de la misma forma que los transcritos de fibrilarina y se obtuvo el nivel relativo de los transcritos de fibrilarina ajustado a la carga de ARNr por carril utilizando la relación: ARNm fibrilarina/ARNr. Una vez más la relación con el valor numérico más alto fue normalizada como 100% en cada ensayo de hibridación (Fig 17C).



**Fig 17. Porcentaje de ARNm de fibrilarina en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos. (A)**

Fotografías de cultivos de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos con el set de tinción Hema 3 (B) Se extrajo ARN total de epimastigotes en Fase Logarítmica (FL) Fase Estacionaria (FE) y un cultivo enriquecido con tripomastigotes metacíclicos (Mc) El ARN transferido en membrana de nylon se hibrido con las sondas gene-específicas de fibrilarina. Como control de carga se uso la hibridación de ARNr con la sonda pRTc32.

(C) Los niveles de ARNm de fibrilarina se obtuvieron a partir de la relación ARNm de Fib / ARNr 24S $\beta$  de las cantidades de marca radiactiva por tiempo. Los valores se graficaron en porcentaje con respecto al tipo de cultivo. En rojo se muestra el nivel de ARNm Fib 40 / Fib 50 y en azul el nivel de ARNm Fib 150 / Fib 250, la relación con mayor valor en cada hibridación se normalizó a 100%.

## 6. Discusión.

La fibrilarina es una proteína nucleolar capaz de metilar la ribosa en la posición 2' en nucleótidos específicos del pre-ARNr. Durante la biogénesis de los ribosomas esta proteína forma un complejo activo al asociarse con 3 proteínas accesorias: 15.5k, Nop56 y Nop58 (Bachelierie y Cavaillé, 1997; Bachelierie y Cavaillé, 1998; Barth et al, 2008; Dunbar et al, 2000; Reichow et al, 2007). Este complejo proteico es guiado por el apareamiento del pre-ARNr con las secuencias de los ARN pequeños nucleolares (snoRNA) de clase C/D (Alberts et al, 2000; Bachelierie y Cavaillé, 1997; Barth et al, 2008; Dunbar et al, 2000; Jansen et al, 1991; Raška et al, 2006; Reichow et al, 2007; Rosete et al, 2007; Uliel et al, 2003).

La fibrilarina además de participar en la arquitectura del nucleolo y en la modificación del ARNr, ha sido utilizada como marcador de las funciones nucleolares en diferentes organismos (Barneche et al, 2000, David et al, 1997; Dunbar et al, 2000; Jansen et al, 1991; Jiménez-García et al, 2008, Tollery et al, 1991).

Uno de los intereses del grupo de trabajo del Dr. Roberto Hernández se centra en la biogénesis del ribosoma, particularmente del ARN ribosomal y en la estructuración del nucléolo de *T. cruzi* (Castro et al, 1981; Hernández et al, 1988; Hernández et al, 1990; Gómez et al, 1991; Hernández-Rivas et al, 1992; Cevallos et al, 2005; López-Velázquez et al, 2005). Se ha reportado que en estadios no proliferativos el nucleolo se desensambla y la transcripción de ARNr se abate (Eliás et al, 2001, Nepomuceno et al, Datos no publicados).

En el presente trabajo se presenta la caracterización del sistema génico de fibrilarina y sus transcritos en diferentes condiciones de proliferación celular.

El genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener se encuentra disponible en la base de datos de genedb (Aslett et al, 2010, Weatherly et al, 2009, Westenberger et al,

2005). Dentro de los datos reportados en genedb se contempla, la localización cromosómica de cada gen distinguiendo entre los haplotipos Esmeraldo (S) y No-Esmeraldo (P), acceso a la base de datos de TriTryp, localización celular y proceso biológico en el que esta involucrada la proteína codificada, función molecular, secuencia en nucleótidos y aminoácidos. La clave de acceso (ID) de los genes reportados como fibrilarina putativa dentro de la base de datos de genedb son los siguientes: Tc00.1047053510105.50, Tc00.1047053509715.40, Tc00.1047053511287.150 y Tc00.1047053506211.250. Las principales características de estos alelos se reportan en la Tabla 1. Como se mencionó en los Resultados a cada gen se le asignó una clave con el fin de facilitar el análisis durante la realización del presente trabajo de Tesis, la nomenclatura usada contempla en primer lugar la contracción "Fib" seguido por los últimos números del ID.

Para iniciar la caracterización del sistema génico de fibrilarina se realizó un análisis bioinformático, con ayuda del programa computacional ClustalW se obtuvo el alineamiento a nivel nucleótidos de los alelos de fibrilarina (Anexo I).

Con el análisis de los porcentajes de similitud entre los alelos se dedujo que el par de genes Fib 40 / Fib 50 (99% de identidad) y el par Fib 150 / Fib 250 (96% de identidad) se encuentran relacionados estrechamente, probablemente la copia de cada alelo fue adquirida en los eventos de hibridación que dieron origen a la cepa, por lo que se considera que el sistema génico de fibrilarina es un sistema integrado por 2 genes, cada gen esta representado por 2 alelos, de los cuales uno es de haplotipo Esmeraldo y el otro No-Esmeraldo (Sistema de 2 pares alélicos). Cuando se realizó el alineamiento entre el par Fib 40 / Fib 50 y Fib 150 / Fib 250 se observó una similitud del 63 a 64%, dichas diferencias se observan principalmente en la región 5' de las secuencias (Anexo I).

También se analizó el alineamiento a nivel de aminoácidos, el porcentaje de similitud en par Fib 40 / Fib 50 fue de 99%, sin embargo un rasgo que llama la atención es la presencia una elongación de 12 residuos en la región amino

terminal, esto puede deberse a una mala anotación en la base de datos del alelo Fib 40, también cabe considerar que esta extensión se encuentra dentro del dominio variable de la proteína (Uliel, 2004). En el alineamiento entre el par Fib 150 / Fib 250 observó una identidad del 96%, se observan 11 sustituciones y 1 deleción, los aminoácidos que sustituyen no son similares propiedades (Anexo IV). El alineamiento entre el Fib 50 y Fib 150 muestra un 64% en similitud, además se distinguen los elementos característicos encontrados en ortólogos de fibrilarina en otras especies (Fig. 18; Uliel et al, 2004).

```

Fib_50      MNSHCDIEFKNSAMRGGFGRRGGFRGGGRGGSSARGRGGASRGAGRGGPGRRGRRGGGG 60
Fib_150    MRGG-----RGGGGRG--GRGGGRGGGRGGGRGGGRGGGRGGGGRRGGGGRG--GGRGGS 51
           *..          :... **   ***  ***** ..   ** . *.***** **  *****.

Fib_50      AGAK-VVVEPHMLHPGVFISKGADSLCTLNMVPGVSVYGEKRIELGATQGGDEKKEYRL 119
Fib_150    SAVRGNVQPHARMRGCYLLAG-KDTLATKSLVPGVSIYGEKRVSGTIAGETESTEFRV 109
           :..:  *.:**   *  : :  *  *:*.*  .:*****:*****:. *:  *  *..*:*:

Fib_50      WNPYRSKLAAAIYAGVGSIHMKPGSKVLYLGGASGTTVSHVSDLVGPEGMVYAIIEFSNRS 179
Fib_150    WNPYRSKLAAAIYSGVAQIYMEPGSSVLSLGAASGTTVSHVSDLVGPEGVVYAVEFSHRS 169
           *****:*.:.*::*:*.* ** .*****:*****:***:***:*

Fib_50      GRDLVDMSKRRPNIVPIIEDARYPMKYRMLVP-MVDCVFMDVAQPDQARILALNAQAF 238
Fib_150    GRDLEEMTKRRNNIVPILEDARYPQKYRMLIPRLVDCFMDVAQPDQARILALNAQHFLK 229
           ***  :*:* **  *****:*****  *****.*  :***:*****:*****  ***

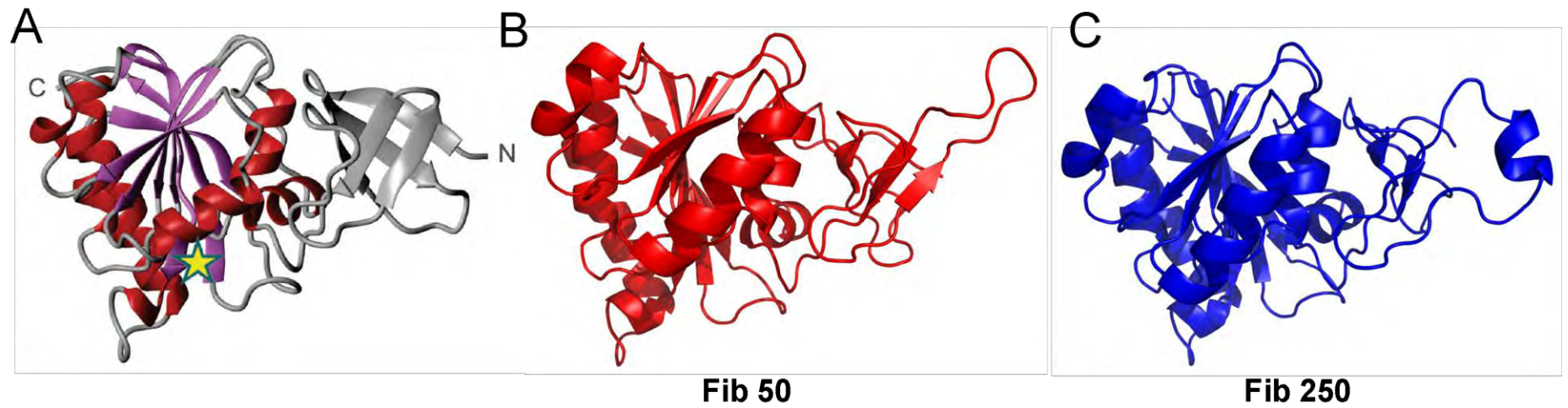
Fib_50      NGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIASELNKLRKDRDKPLEQASLEPFERDHAVVGVYRS 298
Fib_150    ENGGFVISIKANCIDSTADPATVFASEVQKLKDSGLRPKEQASLEPFERDHAVVAGYYKC 289
           :.*  :*****  :...*:***:*.:.  *:*  *****:*****.*  *:.

Fib_50      VKRKTE 304
Fib_150    PPK--- 292
           :

```

**Fig. 18 Estructura primaria de las 2 isoformas de fibrilarina.** En la estructura primaria de las dos isoformas es posible identificar los elementos característicos de fibrilarina como es su tamaño, la región amino terminal rica en glicina y arginina (gris), el final de la región GAR marcada con el dipéptido PH (negrita), la región conservada entre especies donde alberga el centro catalítico (morado) y el residuo que se cree interactúa con el co-factor Adomet (amarillo).

En los modelos obtenidos de estructura terciaria de las dos isoformas de fibrilarina en *T. cruzi* se distingue la región catalítica altamente conservada la cual esta integrada por 7 láminas  $\beta$  plegadas rodeadas por 3 hélices  $\alpha$  de cada lado, por otra parte los cambios estructurales son más evidentes en la región GAR del extremo amino terminal lo que coincide con las estructuras reportadas de fibrilarinas en otros organismos (Fig 19; Uliel et al, 2004).



**Fig. 19 Modelaje molecular de las 2 isoformas de fibrilarina.** (A) Estructura cristalográfica de la fibrilarina arquea (1FBN). Los principales elementos de la estructura se identifican en colores (Rojo:  $\alpha$ -helices; violeta:  $\beta$ -plegadas; gris: región variable) Imagen: Uliel, 2009. (B) Modelo molecular de la estructura cristalográfica de Fib 50. (C) Modelo molecular de la estructura cristalográfica de Fib 250.

Existen pocos reportes de organismos que expresan isoformas de fibrilarina como por ejemplo: *Trypanosoma. brucei* y *Arabidopsis thaliana* (Barneche, 2000; Pih et al. 2000), *T. cruzi* (CL brener) tiene 2 genes que probablemente codifiquen esta proteína y además son distintos en un porcentaje considerable, lo que hace este sistema génico interesante para su caracterización.

En el presente estudio fue necesario obtener secuencias específicas de los 2 genes con el fin de ser usados como sondas gene-específicas en la caracterización de los contigs de los alelos y en la expresión de transcritos. Los insertos son liberados de la región múltiple de clonación con la enzima de restricción *EcoRI* (Fig 12), para ser utilizadas como sondas moleculares.

Antes de poder utilizar las sondas en la caracterización génica y expresión de transcritos, fue necesario realizar ensayos dirigidos descartar alguna hibridación cruzada. Situación comprobada experimentalmente (Fig. 13)

De igual forma se caracterizó la especificidad de las sondas en el reconocimiento de las regiones codificadoras de los alelos de fibrilarina, con ensayos tipo Southern blot utilizando ADN genómico digerido (Fig. 15)

Se caracterizaron los transcritos reconocidos por las sondas Tc50Fibr y Tc250Fibr. Esto se hizo de ARN total aislado de epimastigotes en diferentes fases de la curva de crecimiento (Fig. 16 B).

Proponemos que el tamaño del ARNm maduro codificador de los genes Fib 50/Fib 40 y Fib 150/Fib 250 es de ~2.1Kb (Fig. 16 A), ya que este tamaño es consistente con el reportado para el transcrito de fibrilarina (NOP1) de la especie africana *Trypanosoma brucei* (Barth et al. 2008). El ARNm de fibrilarina es de un tamaño suficiente para albergar la región codificadora de la proteína, junto con la región del miniexón en el extremo 5' y la cola de poli A en el extremo 3' que se agregan a los ARNm durante el procesamiento de *trans-splicing* (Fig. 2). En la placas radiográficas de la Fig. 16 A se observan 2 bandas de mayor tamaño a 2.1



Kb, estas probablemente provengan de la hibridación de las sondas Tc50Fibr y Tc150Fibr, con los posibles precursores del ARNm de fibrilarina, ya que se ha reportado ampliamente que en la transcripción de los tripanosomátidos se generan unidades policistrónicas de ARN que posteriormente son procesadas por mecanismo de *trans-splicing* (Haile y Papadopoulou, 2007; Stiles et al. 1999). La banda que se observa debajo de 2.1 kb probablemente corresponda de la degradación de ARNm de fibrilarina.

La curva de crecimiento de epimastigotes representa una condición experimental útil para analizar la biología proliferativa de un parásito que transita de un estadio de división celular a otro donde no se divide. Sabemos que la transcripción total y el nucléolo son regulados en concierto con el estado de proliferación de epimastigotes. Fibrilarina, proteína involucrada en la biogénesis de ribosomas es probablemente expresada diferencialmente en estadios proliferativos y de diferenciación (Cevallos et al, 2005; Tyler y Egman, 2001).

La abundancia del transcrito de fibrilarina disminuye conforme el cultivo envejece (20 días de incubación), posteriormente cuando estos parásitos son colocados en medio fresco, la cantidad de ARNm aumenta a niveles comparables a los iniciales en un tiempo relativamente corto (3 días de incubación en medio fresco). Esta situación fue corroborada cuantitativamente con el programa computacional Quatity One (BioRad) y la hibridación de los filtros con una sonda con secuencias génicas del ARNr como control de carga (Cevallos et al, 2005). Las señales fueron normalizadas como es descrito en Material y métodos, y son reportadas como porcentajes en la Fig. 16 B junto con la curva de crecimiento de epimastigotes.

Goldenber y colaboradores reportaron que los epimastigotes de Fase Estacionaria pierden la capacidad de proliferar y la transcripción disminuye (Goldenberg et al, 1985). En *T. brucei* se observó que en fases estacionarias y fases infectivas, la síntesis de ARN es prácticamente nula (Pays et al, 1993). En

el año 2000, Tyler y Egman describieron que la elongación flagelar, la pérdida de la capacidad de proliferar y la baja transcripción, son algunos de los factores importantes que provocan la diferenciación del parásito a fases infectivas/no proliferativas (Tyler y Egman, 2000); en el año 2001 demostraron que la elongación de los epimastigotes de fase logarítmica esta estrechamente relacionada con disminución de la concentración de glucosa produciendo las formas estacionarias de epimastigotes (Tyler y Egman, 2001). Elias y colaboradores en el año 2001 describieron que en estadios donde el parásito no prolifera, como lo son los tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes de fase estacionaria, existe una desorganización del nucleolo y la síntesis de ARN ribosomal disminuye (Elias et al, 2001). Fibrilarina al ser una proteína que participa en la arquitectura del nucleolo y en la modificación de pre-ARNr, probablemente su expresión a nivel de ARNm este relacionado con lo anterior. Adicionalmente se cree que en *T. cruzi* la elongación flagelar, pérdida de la capacidad de proliferar y la baja transcripción son algunos de los factores importantes que provocan la diferenciación del parásito a fases infectivas/no proliferativas (Tyler y Egman, 2000); al inocular los epimastigotes envejecidos en medio con la concentración adecuada de nutrientes, recuperan su capacidad proliferativa, lo que conlleva una activación en la transcripción y traducción, estos tres eventos se llevan a cabo en concierto con la biogénesis de ribosomas en el nucleolo (Gourse et al, 1996, Mélése y Xue, 1995; Reeder, 1992), lo que puede explicar el comportamiento del ARNm de fibrilarina.

La metaciclogénesis es la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos. Esta transición es la mejor caracterizada en el ciclo de vida del parásito. El estrés nutricional que sufre el parásito en la ampolla rectal del insecto vector, es considerado el principal factor que promueve la diferenciación (Ferreira et al, 2007).

*In Vitro*, la Fase Estacionaria de epimastigotes es considerada como una condición que promueve la metaciclogénesis, probablemente dada la baja concentración de nutrientes en el medio de cultivo, particularmente de glucosa

(Cevallos et al, 2005; Tyler y Egman, 2000). Los medios M-16 y el TAU (Triatomine Artificial Urine) que imitan la orina de los triatominos, aumentan la eficiencia de la metacicloogénesis (Contreras et al. 1988, Astolfi et al, 1984). Experimentalmente más del 50 % de la cuenta total de epimastigotes inoculados en medio M-16 se diferencian a trypomastigotes metacíclicos.

La metacicloogénesis es considerada como un evento morfológico extremo que involucra el desensamble de nucleolo, cambios en el metabolismo, la salida del ciclo celular proliferativo (Tyler y Egman, 2001; Elias et al, 2001). En general el desarrollo de estas características está relacionado con la expresión génica (Tyler y Egman, 2000; Krieger et al, 1999).

Para determinar el comportamiento del ARNm de fibrilarina en parásitos proliferativos y no proliferativos, se extrajo el ARN total de 3 cultivos, de los cuales 2 fueron de epimastigotes; el primero de Fase Logarítmica (F Log) y el segundo de Fase Estacionaria (F Est). El tercer cultivo fue enriquecido con tripomastigotes metacíclicos al incubar epimastigotes F Log, en medio M-16, tal como esta descrito en Material y Métodos. La cuenta de parásitos esta reportada en la Tabla 6.

Los estadios en *T. cruzi* se distinguen principalmente por la forma de la célula, la presencia de flagelo, la posición del cuerpo basal, cinetoplasto y núcleo: El epimastigote tiene una forma elongada, el flagelo se origina próximo del núcleo y emerge por un costado de la célula (Elias et al, 2001; Storino y Milei, 1994); y el tripomastigote es una forma elongada del parásito, el cinetoplasto esta situado por detrás del núcleo y el flagelo recorre toda la célula (Elias et al, 2001; Storino y Milei, 1994).

Esta descripción es comparable con los cultivos utilizados. La Fig 17 A representa la morfología celular en las poblaciones celulares estudiadas antes y después de la diferenciación *in Vitro*.

La hibridación de las sondas marcadas Tc50Fibr y Tc150 Fibr con el ARN total fue realizada como se describe en Material y Métodos, así mismo el revelado de la placa radiográfica (Fig. 17 B).

La hibridación confirmó la presencia de los transcritos de fibrilarina de ~2.1Kb encontrados en los ensayos anteriores. Disminuye el nivel de transcrito en fases estacionarias, lo que concuerda con el análisis anterior, sin embargo la disminución del transcrito presente es más evidente en el ARN total proveniente del cultivo enriquecido con formas metacíclicas.

Varios grupos de investigación han realizado el análisis de la transcriptómica y proteómica de las distintas etapas de *T. cruzi* durante su ciclo de vida, con el fin de ampliar la búsqueda de genes con patrones de expresión relevantes, y para aprender más sobre la biología de *T. cruzi* en general (Avila, 2003, Minning, 2003; Parodi-Talice, 2007; Koumandou, 2008). Debido a que bastantes de estos análisis no reportan datos cuantitativos su alcance es limitado ya que rara vez se correlaciona la transcripción y la abundancia de la proteína. Este último aspecto es de particular importancia para *T. cruzi* y otros cinetoplástidos, debido a la opinión generalmente aceptada que la regulación de la expresión génica casi en su totalidad post-transcripcional (Campbell et al, 2003; Haile y Papadopoulou, 2007).

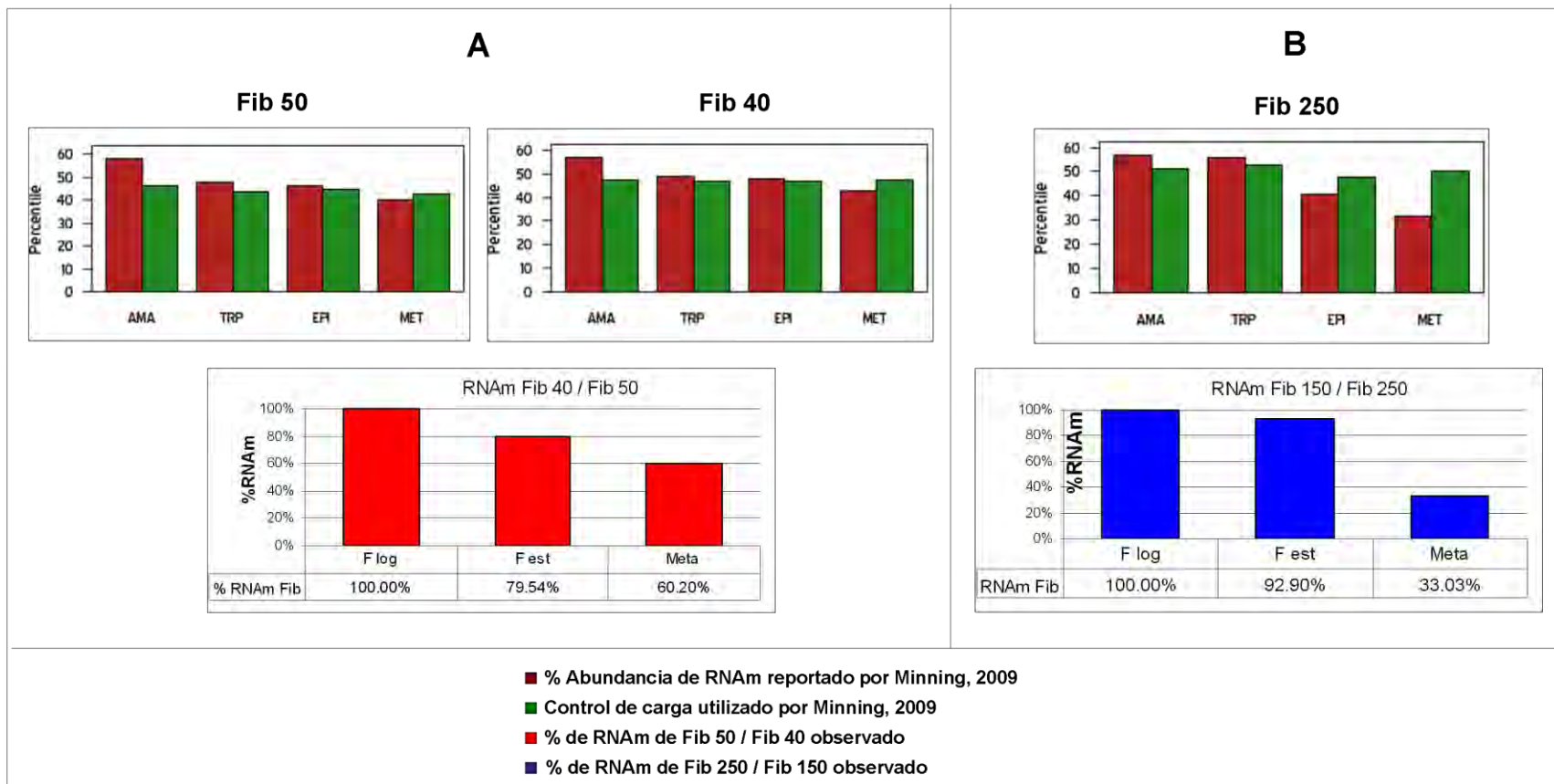
Otros estudios dirigidos a la regulación de la expresión de genes en cinetoplástidos han implicado el procesamiento de ARNm (Jäger, 2003), la represión de traslación (Nardelly et al, 2007), el reclutamiento de polisomas (Mc Nicoll et al, 2005), y la adaptación de codón (Horn, 2008) en la reducción de abundancia del ARNm que determina el nivel de presencia de proteínas.

Existen pruebas abundantes en donde los niveles de transcripción de estos parásitos son controlados por el decaimiento del ARNm con la participación 3'-UTRs y proteínas de unión al ARN (D'Orso y Frasch, 2001; Di Noia et al, 2001; McNicoll et al, 2005; Noe et al, 2008). Estudios previos de microarreglos han

revelado que un número de genes relativamente modesto presentan una regulación transcripcional significativa (Duncan, 2004).

En el año 2009, Manning y colaboradores determinaron el grado de regulación en la abundancia del ARNm en *T. cruzi* por ensayos de microarreglos, el estudio contempla el análisis de la mayoría del genoma parásito en las 4 etapas del ciclo de vida (Manning et al, 2009). Dentro de los transcritos analizados por el grupo de trabajo de Manning se encuentra fibrilarina (cabe aclarar que los estudios realizados en el presente trabajo se hicieron antes de la publicación en la base de datos de Tritryp), en la Fig. 19 se muestran los porcentajes publicados en la base de datos de Tritryp por Manning y colaboradores en diferentes estadios etapas del ciclo de vida del parásito, junto porcentaje de ARNm de fibrilarina en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos reportados experimentalmente en el presente trabajo.

Es importante tomar en cuenta que los ensayos realizados por Manning fueron diferentes a los realizados durante la realización del presente trabajo, sin embargo la disminución de ARNm de fibrilarina es una tendencia entre las poblaciones de epimastigotes y formas metacíclicas que prevalece en los dos estudios, lo que hace suponer que existe realmente una regulación a la baja (down-regulation) en la cantidad de transcrito presente de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos.



**Fig. 20 Nivel de expresión de transcritos de fibrilarina en diferentes etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*.** (A) En la parte superior del panel, en rojo ocre se muestra el porcentaje de abundancia de ARNm de fibrilarina de los genes Fib 50 y Fib 40 reportado por el grupo de trabajo de Minning y publicado en la base de datos de TriTryp en diferentes estadios (AMA: amastigotes; TRIP: tripomastigotes; EPI: Epimastigotes; MET: trypomastigotes metacíclicos), en verde se muestra el control de carga utilizado en los ensayo de microarreglos de Minning y colaboradores (Minning et al, 2009). En la parte inferior del panel se muestra el porcentaje de RNAm de Fib 40 / Fib 50 encontrado en ensayos de *northern blot* en el presente trabajo en 3 poblaciones con diferentes características de proliferación (F log: Epimastigotes en proliferación activa; F est: Epimastigotes sin proliferación; Meta: cultivo enriquecido en formas metacíclicas). (B) En la parte superior del panel, en rojo ocre se muestra el porcentaje de abundancia de ARNm de fibrilarina del gen Fib 250 reportado por el grupo de trabajo de Manning y publicado en la base de datos de TriTryp en diferentes estadios, en verde se muestra el control de carga utilizado en los ensayo de microarreglos de Minning y colaboradores (Minning, 2009). En la parte inferior del panel se muestra el porcentaje de ARNm de Fib 150 / Fib 250 encontrado en ensayos de *northern blot* en el presente trabajo en 3 poblaciones con diferentes características de proliferación.

## Conclusiones.

- Se caracterizó bioinformáticamente el sistema génico de fibrilarina, a partir del genoma accesado, siendo este un sistema integrado por 2 genes, cada gen esta representado por 2 alelos, de los cuales uno es de haplotipo Esmeraldo y el otro No-Esmeraldo (Sistema de 2 pares alélicos).
- Por amplificación, clonación y digestiones enzimáticas se obtuvieron sondas gene-específicas de cada par alélico de fibrilarina (Tc50Fibr y Tc150Fibr), con ellas se caracterizaron los contigs que contienen correspondientes a cada alelo.
- El ARNm maduro de fibrilarina presenta un tamaño de ~2.1 kb para los dos pares alélicos). El ARNm de fibrilarina es de un tamaño suficiente para albergar la región codificadora de la proteína, 2 transcritos de mayor tamaño fueron indentificados probablemente correspondan a precursores del ARNm de fibrilarina.
- La cantidad de transcrito presente en fases estacionarias de epimastigote disminuye, sin embargo la disminución del transcrito presente es más evidente en formas metacíclicas. Al parecer la expresión de fibrilarina se encuentra regulada y esta en concierto en condiciones de proliferación celular.

## 8. Perspectivas:

La presencia de los transcritos de fibrilarina es un indicio de la expresión de la proteína, sin embargo es de gran interés estudiar de la presencia intracelular de fibrilarina con el fin de obtener un marcador de las funciones nucleolares bien caracterizado y que sea capaz de contribuir al entendimiento de la estructuración del nucleolo en estadios no proliferativos del parásito. Para alcanzar esta meta es ideal la localización intranuclear de las isoformas de fibrilarina, se pretende clonar las regiones codificadoras o regiones específicas de los genes de fibrilarina en vectores de expresión para obtener formas recombinantes de cada isoforma. Estos péptidos servirían en la obtención de sueros inmunes específicos con la previa inmunización de animales de laboratorio, una vez obtenidos los sueros se realizaría la inmunodetección en formas replicativas y no replicativas con microscopía electrónica de transmisión.

Es posible la transfección estable de células de *T. cruzi* (Martinez-Calvillo et al, 1997). Por lo que se pretende obtener de clones de *T. cruzi* recombinantes que expresen las dos isoformas fusionadas a una etiqueta (epítotope) identificable inmunológicamente que permita caracterizar la presencia intranuclear de las dos fibrilinas.

Los tripanosomas son capaces de realizar eventos de remplazo génico por recombinación homóloga. De tal forma que es posible interrumpir o eliminar genes de manera dirigida, seleccionando los eventos con la expresión fenotípica de resistencia a antibióticos (e.g., G418, o higromicina). Se contempla la generación y caracterización de mutantes nulas, para cada gen de fibrilarina. Los fenotipos a buscar estarían relacionados con proliferación celular y diferenciación. En la caracterización de estas mutantes resalta la estructuración de nucleolo y presencia de precursores de ARNr no maduros.



## Referencias:

1. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** 2000. Molecular Biology of the Cell. Fourth Edition. Garland
2. **Amin M. A., Matsunaga S., Na. N., Takata H. Yokoyama M., Uchiyama S., Fukuyi K.** 2007. Biochem Biophys Res Commun. 360(2):320-326.
3. **Astolfi Filho S, De Sá M. F., Gander E. S.** 1984. Protein synthesis in purified tryp- and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 41(2):109-15.
4. **Aslett M., Aurrecochea C., Berriman M., Brestelli J., Brunk B. P., Carrington M., Depledge D. P., Fischer S., Gajria B., Gao X., Gardner M. J., Gingle A., Grant G., Harb O. S., Heiges M., Hertz-Fowler C., Houston R., Innamorato F., Iodice J., Kissinger J. C., Kraemer E., Li W., Logan F. J., Miller J. A., Mitra S., Myler P. J., Nayak V., Pennington C., Phan I., Pinney D. F., Ramasamy G., Rogers M. B., Roos D. S., Ross C., Sivam D., Smith D. F., Srinivasamoorthy G., Stoeckert C. J. Jr., Subramanian S., Thibodeau R., Tivey A., Treatman C., Velarde G., Wang H.** 2010. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. Nucleic Acids Res. 38(Database issue):D457-62.
5. **Avila A. R., Dallagiovanna B., Yamada-Ogatta S. F., Monteiro-Góes V., Fragoso S. P., Krieger M. A., Goldenberg S.** 2003. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Genet Mol Res. 31;2(1):159-68.
6. **Barry J. D., McCulloch R.** 2001. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. Adv Parasitol. 2001;49:1-70.
7. **Bachellerie J. P. Cavallé J.** 1997. Guiding ribose methylation of rRNA. TIBS. 22: 157-261.
8. **Bachellerie J. P. Cavallé J.** 1998. SnoRNA-guided ribose methylation rRNA : structural features of the guide RNA duplex influencing the extent of the reaction. Nucleic Acids Research. 26(7):1576-1587.
9. **Bachellerie J. P., Michot B., Nicoloso M., Balakin A., Ni J., Fournier M.** 1995. Antisense snoRNAs : a family of nucleolar RNAs with long complementaries to rRNA. TIBS. 20: 261-264.

10. **Barneche F., Steinmetz F., Echeverría M.** 2000. Fibrillarin Genes Encode Both a Conserved Nucleolar Protein and a Small Nucleolar RNA Involved in Ribosomal RNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *The journal of Biological Chemistry*. 275(35): 27212-27220
  
11. **Barth S., Shalem B., Hurny A., Tkacz I. D. T., Liang X., Uliel S., Myslyuk I. M., Doniger T., Salmon-Divon M., Unger R., Michaeli S.** 2008. Elucidating the Role of C/D snoRNA in rRNA Processing and Modification in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic cell*. 7:86-101.
  
12. **Boisvert F. M., van Koningsbruggen S., Navascués J., Lamond A. I.** 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(7):574-85.
  
13. **Campbell D. A., Thomas S., Sturm N. R.** 2003. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect*. 5(13):1231-40.
  
14. **Campos P. C., Bartholomeu D. C., DaRocha W. D., Cerqueira G. C., Teixeira S. M.** 2008. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 38(12):1383-9.
  
15. **Cassab J. R. A. Noireau F. Guillén.** 1999. Chagas. La enfermedad de Chagas en Bolivia. Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002). Edición Primera. Ediciones Gáficas "E.G.". III: 17-44, 201-247
  
16. **Castro, C., Hernández R., Castañeda M.** 1981. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecular mass species and number of genes. *Molec. and Biochem. Parasitol*. 2: 219-233.
  
17. **Cevallos A. M., Perez-Escobar M., Espinosa N., Herrero J., López-Villaseñor I., Hernandez R.** 2005. The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase. *FEMS Microbiology Letters* 246 (2005) 259–264
  
18. **Contreras V. T., Araujo-Jorge T. C., Bonaldo M. C., Thomaz N., Barbosa H. S., Meirelles Mde N., Goldenberg S.** 1988. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 83(1):123-33.

19. **Croft S. L., Barrett M. P., Urbina J. A.** 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21(11):508-12.
20. **D'Orso I., Frasch A. C.** 2001. Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. *J Biol Chem.* 276(19):15783-93.
21. **David E. J., McNeil J. B., Basile V. and Pearlman R. E.** 1997. An Usual Fibrillar Gene and Protein: Structure and Functional Implications. *Molecular Biology of the Cell.* 8:1051-1061
22. **Di Noia J. M., D'Orso I, Sánchez D. O., Frasch A. C.** 2000. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem.* 7;275(14):10218-27.
23. **Docampo R., de Souza W., Miranda K., Rohloff P., Morenol S.** 2005. Acidocalcisomes? conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology* 3, 251-261
24. **Dunbar D. A., Wormsley S., Lowe M. L. and Baserga S. J.** 2000. Fibrillar-associated Box C/D Small Nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry.* 275:14767-14776.
25. **Duncan R.** 2004. DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol.* 20(5):211-5.
26. **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.** 2005. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, 309(5733):409-415.
27. **Elias M. C., Marques-Porto R., Freymüller E., Shenkman S.** 2001. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol Biochem Parasitol.* 112: 79-90
28. **European Bioinformatics Institute (EBI).** 2010. Software ClustalW2.
29. **Fernández A. P., Nelson K., Beverley S. M.** 1993. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 90, 11608-12.

30. **Ferreira L. R. P., Dossin F. M., Ramos T. C., Freymuller E., Schenkman S.** 2008. Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *An Acad Bras Cienc.* 80 (1): 157-166
31. **Granneman S., Baserga S.J.** 2004. Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Experimental Cell Research.* 296: 43-50
32. **Goldenberg S., Salles J. M., Contreras V. T., Lima Franco M. P., Katzin A. M., Colli W., Morel C. M.** 1985. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 28;180(2):265-70.
33. **Gómez E., Valdéz A.M., Piñero D., Hernández R.** 1991. What is a genus in the Trypanosomatidae family? Phylogenetic analysis of two small rRNA sequences. *Mol. Biol. and Evol.* 8: 254-259.
34. **Gourse R. L., Gaal T., Bartlett M. S., Appleman J. A., Ross W.** 1996. rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* 50:645-77.
35. **Haile S., Papadopoulou B.** 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* Dec;10(6):569-77.
36. **Hernandez R., Diaz-de León F., Castañeda M.** 1988. Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 275–279.
37. **Hernandez R., Martínez-Calvillo S., Hernandez-Rivas R., Gómez E.** 1993. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol Res.* 26: 109-114.
38. **Hernández R., Ríos P., Valdés A. M. y Piñero D.** 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Molec. and Biochem. Parasitol.* 41: 207-212.
39. **Hernández-Rivas R., Martínez-Calvillo S., Romero, M., Hernández, R.** 1992. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: Molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol. Lett.* 92: 63-68.

40. **Horn D.** 2008. Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. *BMC Genomics*. 3;9:2.
41. **Huang J., Van der Ploeg L. H.** 1991. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J.* 10(12):3877-85.
42. **Jäger A. V., De Gaudenzi J. G., Cassola A., D'Orso I., Frasch A. C.** 2003. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(7):2035-42. Epub 2007 Jan 31.
43. **Jansen R. P., Hurt E. C., Kern H., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M., Lapeyre B., Tollervey D.** 1991. Evolutionary Conservation of the Human Nucleolar Protein Fibrillarin and its Functional Expression in Yeast. *Journal of Cell Biology.* 113(4): 715-729.
44. **Jimenez-García L. F., Zavala G., Chavez-Munguía B., Ramos-Godínez M. P., López-Velázquez G., Segura-Valdez M. L., Montañez C., Hehl A. B., Argüello-García R., Ortega-Pierres G.** 2008. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *International Journal for Parasitology.* 38:1297-1304.
45. **Kelley L. A., Sternberg M. J. E.** 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4, 363-371
46. **Koumandou V. L., Natesan S. K., Sergeenko T., Field M. C.** 2008. The trypanosome transcriptome is remodelled during differentiation but displays limited responsiveness within life stages. *BMC Genomics.* 23;9:298.
47. **Lopez-Velazquez G., Hernandez R., Lopez-Villaseñor I., Reyes-Vivas H., Segura-Valdez M. L., Jiménez-García L. F.** 2005. Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis* 11:293-299.
48. **Lyford D. W.** 2006. PyMOL software. Delano Scientific LLC
49. **Lynnon BioSoft.** 1996. Sequence Analysis Software DNAMAN.

50. **Macedo A. M., Machado C. R., Oliveira R. P., Pena S. D.** 2004. Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99(1):1-12.
51. **Martínez-Calvillo S., López I., Hernández R.** 1997. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of Trypanosoma cruzi transfectants. Gene. 199(1-2):71-6
52. **Maslov, D. A., Simpson, L.** 1995. Evolution of the parasitism in kinetoplastid protozoa. Parasitol. Today 11:30-32.
53. **Medina-Acosta E., Cross G.** 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple mini-prep procedure. Molecular and Biochemical Parasitology 59:327-330
54. **Mélèse T., Xue Z.** 1995. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. Current Biology. 7:319-324
55. **Mandel C. R., Bai Y., Tong L.** 2008. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. Cell Mol Life Sci. 65(7-8):1099-122.
56. **McGhee R. B., Cosgrove W. B.** 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. Microbiol. Rev. 44: 140-173.
57. **McNicoll F., Müller M., Cloutier S., Boilard N., Rochette A., Dubé M., Papadopoulou B.** 2005. Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in Leishmania. J Biol Chem. 21;280(42):35238-46.
58. **Minning T. A., Bua J., Garcia G. A., McGraw R. A., Tarleton R. L.** 2003. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol. 131(1):55-64.
59. **Nardelli S. C., Avila A. R., Freund A., Motta M. C., Manhães L., de Jesus T. C., Schenkman S., Fragoso S. P., Krieger M. A., Goldenberg S., Dallagiovanna B.** 2007. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of Trypanosoma cruzi. Eukaryot Cell. 6(2):337-45.

60. **Noé G., De Gaudenzi J. G., Frasch A. C.** 2008. Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Mol Biol.* 8;9:107.
61. **Parodi-Talice A., Monteiro-Goes V., Arrambide N., Avila AR, Duran R., Correa A., Dallagiovanna B., Cayota A., Krieger M., Goldenberg S., Robello C.** 2007. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J Mass Spectrom.* 42(11):1422-32.
62. **Pays E., Hanocq-Quertier J., Hanocq F., Van Assel S., Nolan D., Rolin S.** 1993. Abrupt RNA changes precede the first cell division during the differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms into procyclic forms in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* 61(1):107-14.
63. **Pellé R. B.** Murphy. 1993. Northern Hybriditation: rapid and simple electrophoretic conditions. *Nucleic Acids Research*, 1993, Vol. 21, No. 11
64. **Pih K. T., Yi M. J., Liang Y. S., Shin B. J., Cho M. J., Hwang I., Son D.** 2000. Molecular cloning and targeting of a fibrillarlin homolog from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2000 May;123(1):51-8.
65. **Raška I., Shaw P. J., Cmarko D.** 2006. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Current Opinion in Cell Biolology.* 18:325-334.
66. **Reeder R. H.** 1992. Regulation of transcription by RNA polymerase I. En: transcriptional regulation (S. I. Mc Knight y K.R. Yamamoto, eds). CSHL Press, Nueva York. pp. 315-347.
67. **Reichow S. L., Hamma T., Ferré-D'Amare A. R., and Varani G.** 2007. The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acid Research.* 35(5): 1452-1464.
68. **Rosete M., Prados M. R., Vindrola O.** 2007. El nucleolo como un regulador del envejecimiento celular. *Medicina (Buenos Aires).* 67: 183-194.
69. **Schmeing T. M., Ramakrishnan V.** 2009. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* 461, 1234-1242

70. **Southern E. M.** 1974. An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal Biochem*, 62(1): 317-318.
71. **Stiles J. K., Hicock P. I., Shah P. H., Meade J. C.** 1999. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999 Dec;93(8):781-807. Review.
72. **Stevens, J. R., Noyes, H. A., Schofield, C. J., Gibson, W.** 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*, 48, 1-56.
73. **Storino R., Milei J.** 1994. Enfermedad de Chagas. Doyma Argentina, Division Mosby. 3:31-40
74. **Tollervey D., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M., Hurt E. C.** 1991. The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO Journal*. 10: 573-583.
75. **Tyler K. M., Engman D. M.** 2000. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 46(4):269-78.
76. **Tyler K. M., Engman D. M.** 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 1;31(5-6):472-81.
77. **Uziel S. Liang X., Unger R., Michaeli S.** 2004. Small nucleolar RNAs that guide modification in trypanosomatids: repertoire, targets, genome organization, and unique functions. *Int J for Parasitol*. 34: 445-454.
78. **Weatherly D. B., Boehlke C., Tarleton R. L.** 2009. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics*. 1;10:255.
79. **Westenber S., Bernabé C., Campbell D., Stum N.** 2005 Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171:527-543.



## **Anexo Soluciones y medios de cultivo.**

### Agua tratada con DEPC

- Dietil pirocarbonato 0.1%
- Agitación por 1 noche en agua bidestilada a temperatura ambiente.
- Esterilizar en autoclave.

### Amortiguador MOPS/EDTA (10x)

- MOPS 32.33g
- EDTA 1.86g
- Aforar a 500ml H<sub>2</sub>O-DEPC, filtrar por milipor 0.45 µm.
- Almacenar en frasco ámbar.

### Amortiguador PBS

- NaCl 8g
- KCl 0.2g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g
- Aforar a 1L con agua desionizada y esterilizar en autoclave

### Amortiguador TBE (5x)

- Tris base 54g
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 27.4g
- EDTA 4.65g
- Aforar a 1L

### Amortiguador TE (10,0.2)

- 10mM Tris pH 7.4
- 0.2mM EDTA pH 7.2

### Medio LB líquido

- Bacto-triptona 10g
- Extracto bacto-levadura 5g
- NaCl 10g
- Aforar a 1L con agua desionizada
- Ajustar pH a 7.0 con NaOH y esterilizar en autoclave

### Medio LB Agar

- A Medio LB líquido se le agrega además 15 g de bacto agar.

### Medio LIT (Liver Infusion triptone medium):

- NaCl 4g
- KCl 0.4g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8g
- Glucosa 2g
- Triptosa 5g

- Liver infusion broth 5g
- Se ajusta a pH 7.2 con HCl conc.
- Se afora a 1L con agua desionizada y esterilizar medio en autoclave

#### Medio M-16

- NaCl 0.4%
- KCl 0.04%
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8%
- Glucosa 0.2%
- Triptosa 0.125%
- suero fetal bovino 2.5%
- Se ajusta a pH 6.7 con HCl conc.
- Calentar a 68°C por 1h a, después filtrar para esterilizar en autoclave

#### Medio SOC

- Triptona 20g
- Extracto de levadura 5g
- NaCl 0.5g
- Disolver en 950 ml de agua desionizada
- KCl 250mM 10ml
- Llevar a 980ml
- Ajustar pH 7 con NaOH 5M y esterilizar en autoclave.
- A 55°C agregar 10 ml de MgCl<sub>2</sub> y 10 ml de glucosa 2 M (esterilizados por filtración 0.22µm).

#### Medio YT2X

- Bactotripton 1.6%
- Extracto de levadura 1%
- NaCl 0.5%
- Ajustar a pH 7.2 y esterilizar en autoclave.

#### TB con DMSO

- PIPES 0.15g
- CaCl<sub>2</sub> 0.11g
- KCl 0.93g
- MnCl<sub>2</sub> 0.54g
- Aforar a 50 ml
- Disolver en agua desionizada, ajustar pH a 6.7 con KOH
- Filtrar por milipor 0.45 µm
- Al resuspender el botón de células agregar DMSO a una concentración final de 7%

## Anexo I

Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los genes de fibrilarina, con el programa computacional ClustaW2:

```

Fib_40      ATGTTCTTCT  TTCTTTCATT  TTTTTTTTTT  CAATTTATGA  ATTCTCACTG  CGATATCGAA  60
Fib_50      -----
Fib_150     -----
Fib_250     -----
                                         *

Fib_40      TTTAAGAATA  GCGCAATGCG  TGGAGGATTC  GGTCGTGGAG  GGTTCGCGG  TGGTGAAGA  120
Fib_50      TTTAAGAATA  GCGCAATGCG  TGGAGGATTC  GGTCGTGGAG  GGTTCGCGG  TGGTGAAGA  84
Fib_150     TGC GCGGAGG  CCGTGGTG-G  TGGACGCGGT  GGTGACGTG  GCGGTGG---  TGGACGTGGC  57
Fib_250     TGC GCGGAGG  CCGTGGTG-G  CGGAGGTCGC  GGAGGTCGCG  GCGGTGGACG  TGGTGGTGA  60
*   *   *   **   *   *   ****   *   **   *   *   *   *   *   **   *   *

Fib_40      GCGGTTGGTT  CCTCTGCACG  AGGTCGTGGC  GGTGCGTCAC  GAGGCGCTGG  AAGGGTGGT  180
Fib_50      GCGGTTGGTT  CCTCTGCACG  AGGTCGTGGC  GGTGCGTCAC  GAGGCGCTGG  AAGGGTGGT  144
Fib_150     GGTTGGTGGAC  GTGGCGGTGG  TGGACGTGGC  GGTGG---TG  GACGCGGTGG  CGGTGGTCTG  114
Fib_250     CGCGTTGGTG  GACGCGGTGG  TGGTCGCGGC  GGTGG---AC  GTGGCGGTGG  TGGTGGACGT  117
*   *****   *   *   **   *   *   ****   *   *   ***   ***   *   **   **

Fib_40      CCTGGCCGTG  GAGGGCGGGG  AGGCCGCGGT  GGAGGTGC--  TGGTGCCAAG  -GTTGTTGTG  237
Fib_50      CCTGGCCGTG  GAGGGCGGGG  AGGCCGCGGT  GGGGTGC--  TGGTGCCAAG  -GTTGTTGTG  201
Fib_150     GCGGTTGGTG  GACGTGGCGG  TGGACGTGGG  GGGAGTTCGG  CGGTTCGGGG  TAACGTTTTT  174
Fib_250     GCGGTTGGTG  GACGTGGCGG  TGGACGTGGG  GGGAGTTCGG  CGGTTCGGGG  TAACGTTTTT  177
*   *   *   **   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Fib_40      GAACCTCACA  TGCTTCACCC  TGGAGTATTT  ATTTCCAAAG  GAAAGGCCGA  TTCGTTTGT  297
Fib_50      GAACCTCACA  TGCTTCACCC  TGGAGTATTT  ATTTCCAAAG  GAAAGGCCGA  TTCGTTTGT  261
Fib_150     CAGCCTCAGC  CTCGCATGCG  TGGTTGCTAC  CTGCTTGCCG  GCAAAG---A  TACCCTGGCG  231
Fib_250     CAGCCTCAGC  CTCGCATGCG  TGGATGCTAC  CTGCTTGCCG  GCAAAG---A  TACCCTGGCG  234
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Fib_40      ACTCTGAACA  TGGTTCCTGG  AGTTTCAGTT  TACGAGAGAA  AAAGGATTGA  ACTAGGGGCA  357
Fib_50      ACTCTGAACA  TGGTTCCTGG  AGTCTCAGTT  TACGAGAGAA  AAAGGATTGA  ACTAGGGGCA  321
Fib_150     ACAAAAGTCCC  TAGTGCCTGG  TGTTTCCATC  TACGGGGAAA  AGCGGTCAG  --TGGCACCA  289
Fib_250     ACAAAAGTCCC  TAGTGCCTGG  CGTTTCCATC  TACGGGGAAA  AGCGGTTCAG  --TGGCACCA  292
**   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Fib_40      ACGCAAGGTG  GTGATGAGAA  GAAAGAATAT  CGTCTTTGGA  ATCCATATCG  TTCAAAGCTT  417
Fib_50      ACGCAAGGTG  GTGATGAGAA  GAAAGAATAT  CGTCTTTGGA  ATCCATATCG  TTCAAAGCTT  381
Fib_150     TTGCGGGGGA  GACG-GAGTC  CACTGAGTTC  CGTGTGTGGA  ATCCGTACCG  CTCCAAGTTG  348
Fib_250     TTGCGGGGGA  GACG-GAGTC  CACTGAGTTC  CGTGTGTGGA  ATCCGTATCG  CTCCAAGTTG  351
**   **   *   ***   *   **   *   ***   *   *   *   *   *   *   *   *

Fib_40      GCCGCTGCCA  TTTATGCTGG  TGTGGGAGT  ATTCATATGA  AACCAGGATC  GAAAGTTCTT  477
Fib_50      GCCGCTGCCA  TTTATGCTGG  TGTGGGAGT  ATTCATATGA  AACCAGGATC  GAAAGTTCTT  441
Fib_150     GCAGCTGCCA  TTTATTCGGG  TGTGCTCAG  ATTTACATGG  AGCCGGGATC  CTCTGTGCTT  408
Fib_250     GCAGCTGCCA  TTTATTCGGG  TGTGCTCAG  ATTTACATGG  AGCCGGGTTT  CTCTGTGCTT  411
**   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Fib_40      TATTTGGGAG  GTGCAAGCGG  TACAACGTG  AGTCATGTGA  GTGACTTGGT  TGGACCCGAA  537
Fib_50      TATTTGGGAG  GTGCAAGCGG  TACAACGTG  AGTCATGTGA  GTGACTTGGT  TGGACCCGAA  501
Fib_150     TACCTTGGAG  CTGCCAGCGG  AACCACCGTT  AGTCATGTTT  CGGACCTGGT  AGGACCAGAG  468
Fib_250     TCCTTGGAG  CCGCCAGCGG  AACCACCGTT  AGTCATGTTT  CGGACCTGGT  AGGACCAGAG  471
*   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Fib_40      GGTATGGTTT  ATGCGATAGA  GTTTTCGAAT  CGCAGTGGTC  GCGATCTTGT  TGATATGTCG  597
Fib_50      GGTATGGTTT  ATGCGATAGA  GTTTTCGAAT  CGCAGTGGTC  GCGATCTTGT  TGATATGTCG  561
Fib_150     GGTGTTGTCT  ACGCGGTGGA  ATTTTCCCAT  CGCAGTGGCC  GTGACTTGGG  GGAGATGACG  528
Fib_250     GGTGTTGTCT  ACGCGGTGGA  ATTTTCCCAT  CGCAGTGGCC  GTGACTTGGG  GGAGATGACG  531
***   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

Fib_40      AAAAGACGGC  CCAACATTGT  TCCCATTATT  GAAGACGCTC  GTTATCCCAT  GAAGTATCGA  657
Fib_50      AAAAGACGGC  CCAACATTGT  TCCCATTATT  GAAGATGCTC  GTTATCCCAT  GAAGTATCGA  621
Fib_150     AAGCGCCGAA  ACAACATTGT  GCCCATCCTG  GAAGATGCTC  GCTATCCACA  GAAGTATCGC  588
Fib_250     AAGCGCCGAA  ACAACATTGT  GCCCATCCTG  GAAGATGCTC  GCTATCCACA  GAAGTATCGC  591
**   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

```



## Anexo II:

### a) Blast de la secuencia del inserto Tc50Fibr:

Secuencia 17.6.09  
clon pGEM-tc50fibr

```
1 CGTTGGGCGA CGTCGCATGC TCCCGGCCGC CATGGCGGCC GCGGGAATTC GATTCCCGAA
61 GGTATGGTTT ATGCGATAGA GTTTTCGAAT CGCAGTGGTC GCGATCTTGT TGATATGTCG
121 AAAAGACGGC CCAACATTGT TCCCATTTATT GAAGATGCTC GTTATCCCAT GAAGTATCGA
181 ATGCTTGTGC CTATGGTTCGA TTGCGTATTT ATGGATGTTG CCCAACCAGA TCAAGCACGT
241 ATTCTTGCTC TTAATGCACA GGCATTTTGG AAGAACGGAG GCCATTATGT AATTTCAATC
301 AAGGCAAACG GTATTGATTC AACCTTGGAG GTCCTGTTG TGATTGCATC CGAATTGAAT
361 AAATTAAGAA AGGACCGTTT AAAGCCTTTA GAACAAGCCT CACTTGAGCC AATCACTAGT
421 GAATTCGCGG CCGCTGCAG GTCGACCATA TGGGAGAGCT CCCAACGCGT TGGATGCATA
481 GCTTGAGTAT TCTATAGTGT CACCTAAATA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC
541 CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT
601 GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC
661 CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC CACGCGCGGG
721 GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC
781 GGTCTGTCGG CTGCGGCGAG CG
```

ref|XM\_814791.1| Trypanosoma cruzi strain CL Brener fibrillarin partial mRNA  
Length=915

GENE ID: 3552438 Tc00.1047053510105.50 | fibrillarin  
[Trypanosoma cruzi strain CL Brener] (10 or fewer PubMed links)

Score = 658 bits (356), Expect = 0.0  
Identities = 356/356 (100%), Gaps = 0/356 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 CCCGAAGGTATGGTTTATGCGATAGAGTTTTTCGAATCGCAGTGGTCGCGATCTTGTGAT 60
      |||
Sbjct 496 CCCGAAGGTATGGTTTATGCGATAGAGTTTTTCGAATCGCAGTGGTCGCGATCTTGTGAT 555

Query 61 ATGTCGAAAAGACGGCCCAACATTGTTCCCATTTATGAAGATGCTCGTTATCCCATGAAG 120
      |||
Sbjct 556 ATGTCGAAAAGACGGCCCAACATTGTTCCCATTTATGAAGATGCTCGTTATCCCATGAAG 615

Query 121 TATCGAATGCTTGTGCCTATGGTCGATTGCGTATTTATGGATGTTGCCCAACCAGATCAA 180
      |||
Sbjct 616 TATCGAATGCTTGTGCCTATGGTCGATTGCGTATTTATGGATGTTGCCCAACCAGATCAA 675

Query 181 GCACGTATTCTTGCTCTTAATGCACAGGCATTTTGAAGAACGGAGGCCATTATGTAATT 240
      |||
Sbjct 676 GCACGTATTCTTGCTCTTAATGCACAGGCATTTTGAAGAACGGAGGCCATTATGTAATT 735

Query 241 TCAATCAAGGCAAACGTATTGATTCAACCTTGGAGGCTCCTGTTGTGATTGCATCCGAA 300
      |||
Sbjct 736 TCAATCAAGGCAAACGTATTGATTCAACCTTGGAGGCTCCTGTTGTGATTGCATCCGAA 795

Query 301 TTGAATAAATTAAGAAAGGACCGTTTTAAAGCCTTTAGAACAAGCCTCACTTGAGCC 356
      |||
Sbjct 796 TTGAATAAATTAAGAAAGGACCGTTTTAAAGCCTTTAGAACAAGCCTCACTTGAGCC 851
```

ref|XM\_808354.1| Trypanosoma cruzi strain CL Brener fibrillarin partial mRNA  
Length=951

GENE ID: 3544823 Tc00.1047053509715.40 | fibrillarin  
[Trypanosoma cruzi strain CL Brener] (10 or fewer PubMed links)

Score = 649 bits (351), Expect = 0.0  
Identities = 355/357 (99%), Gaps = 0/357 (0%)  
Strand=Plus/Plus



```

Query 181 CTGCCAACTTGGAGCGGTACGGATTCCACACACGGAAGTCTAGTGGACTCCGTCTCCCCCG 240
          |||
Sbjct 352 CTGCCAACTTGGAGCGGTACGGATTCCACACACGGAAGTCTAGTGGACTCCGTCTCCCCCG 293

Query 241 CAATGGTGTCACTGACGCGCTTTTCCCCGTAGATGGAAACACCAGGCACTAGGGACTTTG 300
          |||
Sbjct 292 CAATGGTGTCACTGACGCGCTTTTCCCCGTAGATGGAAACACCAGGCACTAGGGACTTTG 233

Query 301 TCGCCAG 307
          |||
Sbjct 232 TCGCCAG 226

```

ref|XM\_814374.1| Trypanosoma cruzi strain CL Brener fibrillarin partial mRNA  
Length=879

GENE ID: 3551907 Tc00.1047053506211.250 | fibrillarin  
[Trypanosoma cruzi strain CL Brener] (10 or fewer PubMed links)

Score = 529 bits (286), Expect = 4e-147  
Identities = 300/307 (97%), Gaps = 0/307 (0%)  
Strand=Plus/Minus

```

Query 1 GCTTCGTCATCTCCTCCAAGTCACGGCCACTGCGATGGGAAAATTCACCCGCTAGACAA 60
          |||
Sbjct 535 GCTTCGTCATCTCCTCCAAGTCACGGCCACTGCGATGGGAAAATTCACCCGCTAGACAA 476

Query 61 CACCCTCTGGTCCTACCAGGTCCGAAACATGACTAACGGTGGTTCCGCTGGCAGCTCCAA 120
          |||
Sbjct 475 CACCCTCTGGTCCTACCAGGTCCGAAACATGACTAACGGTGGTTCCGCTGGCAGCTCCAA 416

Query 121 GGTAAAGCACAGAGGATCCCGGCTCCATGTAAATCTGAGCAACACCCGAATAAATGGCAG 180
          |||
Sbjct 415 GGTAAAGCACAGAGGATCCCGGCTCCATGTAAATCTGAGCAACACCCGAATAAATGGCAG 356

Query 181 CTGCCAACTTGGAGCGGTACGGATTCCACACACGGAAGTCTAGTGGACTCCGTCTCCCCCG 240
          |||
Sbjct 355 CTGCCAACTTGGAGCGGTACGGATTCCACACACGGAAGTCTAGTGGACTCCGTCTCCCCCG 296

Query 241 CAATGGTGTCACTGACGCGCTTTTCCCCGTAGATGGAAACACCAGGCACTAGGGACTTTG 300
          |||
Sbjct 295 CAATGGTGTCACTGACGCGCTTTTCCCCGTAGATGGAAACACCAGGCACTAGGGACTTTG 236

Query 301 TCGCCAG 307
          |||
Sbjct 235 TCGCCAG 229

```

### Anexo III:

#### a) Alineamiento entre la sonda Tc50Fibr con el gen Fib 150 en el programa Clustalw2

```

Sonda_Tc50Fibr      -----CCCGAAGGTATGGTT 15
Gen_Fib_150        GCCGCCAGCGGAACCACCGTTAGTCATGTTTCGGACCTGGTAGGACCAGGGTGTGTC 480
                    ** * * * * *

Sonda_Tc50Fibr      TATGCGATAGAGTTTTCGAATCGCAGTGGTCGCGATCTTGTGATATGTCGAAAAGACGG 75
Gen_Fib_150        TACGCGGTGGAATTTCCCATCGCAGTGGCCGTGACTTGGAGGAGATGACGAAGCGCCGA 540
                    ** * * * * *

Sonda_Tc50Fibr      CCCAACATGTTCCCATTTATGAAGATGCTCGTTATCCCATGAAGTATCGAATGCTTGTG 135
Gen_Fib_150        AACAAATGTTGCCCATCTTGAAGATGCTCGTATCCACAGAAGTATCGCATGTTGATC 600
                    * * * * *

Sonda_Tc50Fibr      CCTA--TGGTCGATTGCGTATTATGATGTTGCCCAACCAGATCAAGCACGATTCTT 192
Gen_Fib_150        CCACGATTGGTGGATTGCATCTTTATGATGTTGCCACGCCGATCAGGCACGATCTTG 660
                    * * * * *

Sonda_Tc50Fibr      GCTCTTAATGCACAGGCATTTTTGAAGAACGGAGGCCATTATGTAATTTCAATCAAGGCA 252
Gen_Fib_150        GCGCTGAACGCGCAACATTTCTGAAGAAAATGGCGGTTTGTGCATATCTATCAAAGCC 720
                    * * * * *

Sonda_Tc50Fibr      AACTGTATGATTCAACCTGGAGGCTCCTGTTGTGATGTCATCCGAATTGAATAAATA 312
Gen_Fib_150        AACTGCATTGATTCCACTGCGGATCCCGCCACAGTATTGCCTCTGAAGTGCAGAACTA 780
                    * * * * *

Sonda_Tc50Fibr      AGAAAGGACCGTTTAAAGCCTTTAGAACAAGCCTCACTTGAGCC----- 356
Gen_Fib_150        AAGACTCCGGTCTGAGGCCAAGGAACAGGCCCTCACTGGAGCCCTTTGAACGTATCAT 840
                    * * * * *

Sonda_Tc50Fibr      -----
Gen_Fib_150        GCCGTTGTGAGGGTACTACAAGTGTCCACCGAAGTAA 879

```

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 Sonda_Tc50Fibr	356	2 Gen_Fib_150	879	69

#### b) Alineamiento entre la sonda Tc150Fibr con el gen Fib 50 en el programa Clustalw2

```

Sonda_Tc150Fibr    -----CTGGCGCAAAGTCCCTAGTGCCTGGCGTTTCCATCTACGGGGAA 45
Gen_Fib_50         GGAAAGGCCGATTTCGCTTTGTACTCTGAACATGGTTCCCTGGAGTCTCAGTTTACGGAGAA 300
                    * * * * *

Sonda_Tc150Fibr    AAGCGTGTGAG--TGGCACCATTGCGGGGAGACG-GAGTCCACTGAGTTCCTGTTGG 102
Gen_Fib_50         AAAAGGATTGAACTAGGGCAACGCAAGGTGGTGTGATGAGAAGAAGAATATCGTCTTTGG 360
                    * * * * *

Sonda_Tc150Fibr    AATCCGTATCGCTCCAAGTTGGCAGCTGCCATTTATTCGGGTGTGCTCAGATTTACATG 162
Gen_Fib_50         AATCCATATCGTTCAAAGCTTGGCCTGCCATTTATGCTGGTGTGGAGTATTCATATG 420
                    * * * * *

Sonda_Tc150Fibr    GAGCCGGGTTCCCTCTGTGCTTTCCCTTGGAGCCGCCAGCGGAACCACCGTTAGTCATGTT 222
Gen_Fib_50         AAACCAGGATCGAAGGTTCTTTATTTGGGAGTGCAAGCGGTACAACGTGAGTCATGTG 480
                    * * * * *

Sonda_Tc150Fibr    TCGGACCTGGTAGGACCAGAGGGTGTGTTCTACGCGGTGGAATTTCCCATCGCAGTGGC 282
Gen_Fib_50         AGTGACTTGGTTGGACCGAAGGTATGTTTATGCGATAGAGTTTTCGAATCGCAGTGGT 540
                    * * * * *

Sonda_Tc150Fibr    CGTGACTTGGAGGAGATGACGAAGC----- 307
Gen_Fib_50         CGCGATCTTGTGATATGTCGAAAAGACGGCCCAACATTGTTCCCATTTATGAAGATGCT 600
                    * * * * *

```



SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 Sonda_Tc150Fibr	307	2 Gen_Fib_50	915	63

c) Alineamiento entre la sonda Tc50Fibr y la sonda Tc150Fibr

```

Tc50Fibr      CCCGAAGGTATGGTTTATGCGATAGAGTTTTCGAATCGCAGTGGTCGCGATCTTGTGAT 60
Tc150Fibr     -----CTGGCGACAAAGTCC-C TAGTGCTGGCGTTTCCATCTACGGGGA 44
                **** * ** * * * * * * * * * * *
Tc50Fibr      ATGTCGAAAAGACGGCCCAACATTGTTCCATTATTGAAGATGCTCGTTATCCCATGAAG 120
Tc150Fibr     AAAGCGTGTCAAGTGG--CACCATTGCGGGGAGACGGAGTCCACTGAGTTCCGTGTGTGG 102
                * ** ** * ** * * * * * * * * * * *
Tc50Fibr      TATCGAATGCTTGTGCCTATGGTCGATTGCGTATTTAT--GGATGTTGCCAA--CCAGA 176
Tc150Fibr     AATCCG-TATCGCTCCAAGTTGGCAGCTGC-CATTTATTCGGGTGTTGCTCAGATTTACA 160
                *** * * * * * * * * * * * * * * * * *
Tc50Fibr      TCAAGCACGTTATTCT---TGCTCTTAATGCACAGGCATTTTTGAAG--AACGGAGGCCAT 231
Tc150Fibr     TGGAGCCGGGTTCTCTGTGCTTTCCCT-TGGAGCCGCCAGCGGAACCACCGTTAGTCAT 219
                * *** * * * * * * * * * * * * * * * *
Tc50Fibr      TATGTAATTTCAATCAAGGCAAACTGTATTGATTCAACCTTGGAGGCT-CCTGTTGTGAT 290
Tc150Fibr     GTTTCGGACCTGGTAGGACCAGAGGGTGTGTCTACGCGGTGGAATTTCCCATCGCAGT 279
                * * * * * * * * * * * * * * * * *
Tc50Fibr      TGCATCCGAATTGAATAAATTAAGAAAGGACCGTTTAAAGCCTTTAGAACAAGCCTCACT 350
Tc150Fibr     GGC-CGTGACTTGGAGGAGATGACGAAGG----- 307
                ** * * * * * * * * * *
Tc50Fibr      TGAGCC 356
Tc150Fibr     -----

```

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 Tc50Fibr	356	2 Tc150Fibr	307	15

**Anexo IV:**

**Alineamiento en secuencia de aminoácidos de los genes de fibrilarina con el programa computacional Clustalw2**

```

Fib_250      -----MRGG-----RGGGGRG--GRGGGRGGGRGGGRGGGRGGGGGGRRGG 41
Fib_150      -----MRGG-----RGGGGRG--GRGGGRGGGGRRG-GGRRGGGGRRGGGGRRGG 40
Fib_50       -----MNSHCDIEFKNSAMRGGFGRGGFRGGGRGGSSARGRGGASRGAGRGG 48
Fib_40       MFFFLSFFFFQFMNSHCDIEFKNSAMRGGFGRGGFRGGGRGGSSARGRGGASRGAGRGG 60
              *..          :... * **** * * * * .. ** *.****

Fib_250      GGRGG--GRGSSAVRGNVFPHARMRGCYLLAG-KDTLATKSLVPGVSIYGEKRVSGT 97
Fib_150      GGRGG--GRGSSAVRGNVFPHARMRGCYLLAG-KDTLATKSLVPGVSIYGEKRVSGT 96
Fib_50       PGRGGRRGGGGGAGAK-VVVEPHMLHPGVFISKKGADSLCTLNMVPGVSVYGEKRIELGA 107
Fib_40       PGRGGRRGGGGGAGAK-VVVEPHMLHPGVFISKKGADSLCTLNMVPGVSVYGEKRIELGA 119
              **** ***.:.:.: *.:** * :. * *.:* .:*****:*****.: *.:

Fib_250      IAGETESTEFRVWNPYRSKLAAAIYSGVAQIYMEPGSSVLSLGAASGTTVSHVSDLVGPE 157
Fib_150      IAGETESTEFRVWNPYRSKLAAAIYSGVAQIYMEPGSSVLYLGAASGTTVSHVSDLVGPE 156
Fib_50       TQGGDEKKEYRLWNPYRSKLAAAIYAGVGSIHMKPGSKVLYLGGASGTTVSHVSDLVGPE 167
Fib_40       TQGGDEKKEYRLWNPYRSKLAAAIYAGVGSIHMKPGSKVLYLGGASGTTVSHVSDLVGPE 179
              * *..*.:*****:*****:*.:.:*.:***.* *..*****:*****

Fib_250      GVVYAVEFSHRSGRDLEEMTKRRNNIVPILEDARYPQKYRMLIPRLVDCIFMDVAQPDQA 217
Fib_150      GVVYAVEFSHRSGRDLEEMTKRRNNIVPILEDARYPQKYRMLIPRLVDCIFMDVAQPDQA 216
Fib_50       GMVYAIEFSNRSGRDLVDMSKRRPNIVPIEDARYPMKYRMLVP-MVDCVFMVDAQPDQA 226
Fib_40       GMVYAIEFSNRSGRDLVDMSKRRPNIVPIEDARYPMKYRMLVP-MVDCVFMVDAQPDQA 238
              *:***:***:***** :*:*** *****:***** *****:* :***:*****

Fib_250      RILALNAQHFLKENGGFVISIKANCIDSTADPATVFASEVQKLKDSGLRPKEQASLEPFE 277
Fib_150      RILALNAQHFLKENGGFVISIKANCIDSTADPATVFASEVQKLKDSGLRPKEQASLEPFE 276
Fib_50       RILALNAQAFLKNGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIASELNKLRKDRKPLEQASLEPFE 286
Fib_40       RILALNAQAFLKNGGHYVISIKANCIDSTLEAPVVIASELNKLRKDRKPLEQASLEPFE 298
              ***** ***.:.: ***** :...*:***:*.:.: *.* *****

Fib_250      RDHAVVAGYYKCPPK--- 292
Fib_150      RDHAVVAGYYKCPPK--- 291
Fib_50       RDHAVVGVYRSVKRCKTE 304
Fib_40       RDHAVVGVYRSVKKCKTE 316

```

SeqA	Name	Len (aa)	SeqB	Name	Len (aa)	Score
1	Fib_50	304	2	Fib_40	316	99
1	Fib_50	304	3	Fib_250	292	64
1	Fib_50	304	4	Fib_150	291	64
2	Fib_40	316	3	Fib_250	292	64
2	Fib_40	316	4	Fib_150	291	65
3	Fib_250	292	4	Fib_150	291	96