



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS

“UN ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL  
NUCLÉOLO DE EPIMASTIGOTES DE  
*Trypanosoma cruzi* EN DIFERENTES  
CONDICIONES DE PROLIFERACIÓN”

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

TOMÁS NEPOMUCENO MEJÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO CORIA ORTEGA  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **NEPOMUCENO MEJÍA TOMAS** con número de cuenta **501048477** con la tesis titulada **"UN ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL NUCLÉOLO DE EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* EN DIFERENTES CONDICIONES DE PROLIFERACIÓN"**, realizada bajo la dirección del **Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Secretario: DRA. MARÍA INELDA LÓPEZ VILLASEÑOR  
Vocal: DR. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ  
Suplente: DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGUELLO  
Suplente: DR. ALEJANDRO M. GARCÍA CARRANCA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo,

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de agosto de 2011.

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
Coordinadora del Programa

## AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al CONACYT por la beca otorgada.
- A DGAPA PAPIIT UNAM por los grants IN213708 e IN228810-3 y al CONACYT por el grant 99062.
- A mi comité Tutor: Dr. Alejandro Zentella Dehesa y Dr. Roberto Coria Ortega por guiarme todo este tiempo.
- Al Dr. Santiago Martínez Calvillo y a la Dra. Ana María Cevallos por los consejos y ayuda en todo momento.
- A la M. en C. Juliana Herrera López y a la Candidata a Dr. Reyna Lara Martínez por el apoyo técnico.
- A mi jurado de examen de grado: Dra. Soledad Funes Arguello, Dra. Imelda López Villaseñor, Dr. Luís Felipe Jiménez García, Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez, Dr. Alejandro García Carrancá por los comentarios de esta tesis.
- Infinitamente al **Dr. Roberto Hernández Fernández**, mi tutor.

## INDICE

Lista de figuras	3
Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	7
• <i>Trypanosoma cruzi</i> : Importancia médica y económica	7
• Biología de <i>T. cruzi</i>	9
• Edición de RNA mensajero (RNAm) mitocondrial	12
• Generación de RNAm maduros nucleares en Tripanosomátidos	13
• Del DNA ribosomal al nucléolo de eucariontes superiores	16
• Sistema ribosomal de <i>T. cruzi</i>	23
2. Antecedentes	27
3. Objetivos	28
4. Metodología	29
• Cultivo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	29
• Diferenciación <i>in vitro</i> de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos	29
• Tratamiento de epimastigotes con cicloheximida (CHX)	30
• Ensayos de transcripción (nuclear run on assay)	30
• Microscopía electrónica de transmisión	31
• Determinación del tamaño del nucléolo	32
• Ensayos de retardo (EMSA)	32
• Marcaje radiactivo del DNAr	33

• Interacción del DNAr con proteínas nucleares de epimastigotes	34
5. Resultados	35
• Crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en cultivo	35
• Transcripción <i>in vitro</i>	36
• Microscopía electrónica	37
• Ensayos de retardo	45
• Participación del nucléolo en la metacicloogénesis temprana	47
6. Discusión	50
7. Conclusión	57
8. Perspectivas	58
9. Referencias bibliográficas	59
10. Anexo	64
• Mi artículo	
“The <i>Trypanosoma cruzi</i> nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases” FEMS Microbiol Lett 313: 41-46, 2010.	

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de *Triatoma mexicana*.

Figura 2. El cinetoplasto de epimastigote de *T. cruzi*.

Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Figura 4. Sistema ribosomal general de humanos.

Figura 5. Elementos funcionales localizados en el espaciador intergénico del DNAr.

Figura 6. La Pol I y sus factores proteicos auxiliares.

Figura 7. El nucléolo.

Figura 8. El proteoma nucleolar humano.

Figura 9. Organización de los genes de RNAr de *T. cruzi*.

Figura 10. Elementos funcionales localizados en el IGS del DNAr de *T. cruzi*.

Figura 11. Curva de crecimiento de epimastigotes en cultivo.

Figura 12. Reducción de la actividad transcripcional en epimastigotes de la fase estacionaria del cultivo.

Figura 13. El mantenimiento y el tamaño del nucléolo correlacionan con el estado de proliferación.

Figura 14. El nucléolo de epimastigotes en cultivo.

Figura 15. La arquitectura nucleolar de epimastigotes en cultivo.

Figura 16. Inhibición del crecimiento de epimastigotes en cultivo por CHX.

Figura 17. Reducción de la actividad transcripcional de epimastigotes tratados con CHX.

Figura 18. Efecto de la CHX sobre el tamaño del nucléolo.

Figura 19. Efecto de la CHX sobre el nucléolo de epimastigotes en cultivo.

Figura 20. Fragmento del promotor distal del DNAr de *T. cruzi* de 64 pares de bases de largo que abarca la posición -48 a +16 con respecto al TSP.

Figura 21. Interacción entre el fragmento del promotor del DNAr con las proteínas nucleares de *T. cruzi*.

Figura 22. El nucléolo en la diferenciación celular de epimastigotes.

Figura 23. Diferenciación de epimastigotes *in vitro* en medio M-16.

Figura 24. Células intermedias de *T. cruzi* obtenidas en medio M-16.

## RESUMEN

Nuestro grupo está interesado en el RNAr y en la biogénesis de los ribosomas del protozoario *Trypanosoma cruzi*. Los epimastigotes representan una etapa replicativa del parásito y pueden ser cultivados en medios axénicos. La curva de crecimiento de estas células permite evaluar diferencias potenciales en el nucléolo de células sometidas a diferentes condiciones de proliferación. Para establecer parámetros celulares que permitan el estudio de la biogénesis ribosomal, se realizó un análisis morfométrico del nucléolo de células cultivadas en las fases exponencial y estacionaria. En fotografías de microscopía electrónica del núcleo de la célula, se encontró que el área de la estructura nucleolar es dos veces mayor en células creciendo exponencialmente que en epimastigotes de fase estacionaria. El componente granular del nucléolo de parásitos que se duplican activamente es el principal elemento estructural. Gránulos de este tipo (presumiblemente ribosomas) son abundantes en el citoplasma de células de la fase exponencial. Para evaluar la necesidad potencial de síntesis de proteínas para mantener la arquitectura nucleolar, se analizaron también células tratadas con cicloheximida. Nuestros hallazgos muestran que este fármaco induce una reducción significativa del tamaño del nucléolo sin provocar una disrupción importante de su estructura. Nuestros resultados proveen una base firme para establecer un modelo experimental que permite el estudio de la organización del nucléolo durante el crecimiento y desarrollo de *T. cruzi*.

## ABSTRACT

Our group is interested in rRNA and ribosome biogenesis in the parasite protozoan *Trypanosoma cruzi*. Epimastigotes represent an extracellular replicative stage of *T. cruzi* and can be cultured in axenic media. The growth curve of epimastigotes allows assessment of potential differences in the nucleolus of cells undergoing growth-rate transitions. To establish cellular parameters for studying ribosome biogenesis in *T. cruzi*, a morphometric analysis of the nucleolus of cultured cells in the exponential and stationary phases was conducted. Electron micrograph-based measurements of nuclear sections from independent cells demonstrated that the nucleolar area is over twofold higher in exponentially growing cells, as compared with epimastigotes in the stationary phase. The granular component of the nucleolus of actively growing cells was the main structural element. Cycloheximide moderately reduced the apparent size of the nucleolus without an apparent disruption of their architecture. Our results provide a firm basis for the establishment of an experimental model to study the organization of the nucleolus during the growth and development of *T. cruzi*.

## 1. INTRODUCCIÓN

- ***Trypanosoma cruzi*: Importancia médica y económica**

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un parásito unicelular de importancia médica, económica y biológica. Es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana, también referida como la enfermedad de Chagas. Esta es una zoonosis que hasta hace algunos años era encontrada exclusivamente en el continente Americano, sin embargo, el aumento en la migración de personas de América Latina a otras partes del planeta ha hecho que este padecimiento infeccioso se convierta en un conflicto de carácter mundial. Esto se confirma con el incremento de casos diagnosticados en Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y algunas regiones de Europa (OMS 2008, 2009).

Las cifras estimadas del Banco Mundial sugieren que en Centro y Sudamérica la tripanosomiasis americana es, en términos económicos, más importante que todas las enfermedades parasitarias juntas, incluyendo el paludismo y la leishmaniasis (Imbert et al., 2003). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que la enfermedad de Chagas es un problema relevante de salud pública que afecta de ocho a diez millones de personas, de las que anualmente mueren alrededor de 10,000 individuos (OMS, 2009). A pesar de que el padecimiento, el organismo responsable y los vectores de transmisión fueron descritos hace más de 100 años, aún no se dispone ni de vacunas ni de fármacos eficaces para su erradicación (de Souza, 2007). Hoy en día es una parasitosis ampliamente distribuida en México (Imbert et al., 2003).

Generalmente, la enfermedad de Chagas tiene un período de incubación de cuatro a diez días, y durante su curso puede presentar una etapa aguda y otra crónica. La primera fase dura de uno a cuatro meses y suele ser asintomática. Sin embargo, en ocasiones produce inflamación local, fiebre y dolor de cabeza, entre otros. Durante el segundo periodo, las manifestaciones clínicas más importantes son las alteraciones cardíacas que pueden acabar en discapacidad e incluso en la muerte del individuo. También se han observado complicaciones gastrointestinales que dan lugar a una hipertrofia del esófago y/o del colón. Con menor frecuencia se encuentran afectaciones del sistema nervioso central o inflamación de glándulas y mucosas (OMS, 2008; 2009).

Se han identificado varias vías de transmisión de *T. cruzi* a los seres humanos. El principal mecanismo de infección es a través de las heces y orina de insectos hemípteros de la familia Reduviidae, destacando los Géneros: *Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* (Fig. 1) contaminados con *T. cruzi*. Otras formas en las que el parásito se puede contraer son: las transfusiones sanguíneas, los trasplantes de órganos, la vía placentaria, la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas, en raras ocasiones también por accidentes en el laboratorio (Lorca, 2001).



Figura 1. Fotografía de *Triatoma mexicana*. Especie de triatomino endémica de México (Schettino et al., 2005). Imagen tomada de <http://unibio.unam.mx>

- **Biología de *T. cruzi***

*T. cruzi* es un protozooario que divergió tempranamente del linaje eucarionte después de la adquisición de la mitocondria. Ha sido clasificado dentro del Orden Cinetoplastida, familia Trypanosomatidae, en donde también se encuentran agrupados otros parásitos patógenos del ser humano como son *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*. Los tripanosomátidos se caracterizan por la presencia del cinetoplasto, un organelo complejo formado por DNA empaquetado en maxicírculos y minicírculos localizados dentro de la gran y única mitocondria que poseen (Fig. 2). Dependiendo de la especie, el cinetoplasto llega a constituir del 20 al 25% del contenido total de DNA de la célula (de Souza, 2002).

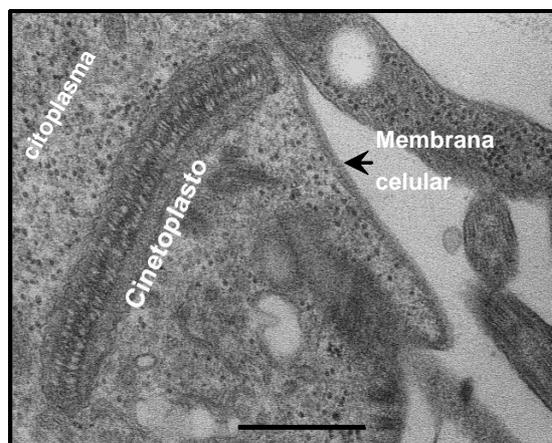


Figura 2. El cinetoplasto de *T. cruzi*. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión donde se observa el arreglo del cinetoplasto de un epimastigote en cultivo. Además, puede ser apreciada una cantidad abundante de ribosomas citosólicos. La barra equivale a 0.5 $\mu$ m.

El curso biológico de *T. cruzi* es un proceso que transcurre en un vector hemíptero y en un reservorio vertebrado (mamífero). En estos hospederos, el

parásito sufre una serie de cambios morfológicos importantes que se acompañan de una regulación de la expresión diferencial de genes.

Están ampliamente aceptadas tres formas de desarrollo principales: epimastigote, tripomastigote y amastigote. La clasificación de estos estadios, se basó tanto en el tamaño del flagelo y en la posición que guarda el cinetoplasto con respecto al núcleo. En amastigotes y en epimastigotes este organelo se localiza anterior al núcleo (Fig. 3B y D). En cambio en los tripomastigotes el lugar que ocupa es posterior al núcleo (Fig. 3A y C; de Souza, 2002).

El ciclo de vida de *T. cruzi* puede comenzar cuando un vector invertebrado ingiere la sangre periférica de un vertebrado infectado con tripomastigotes sanguíneos (Fig. 3A). En la parte media del intestino del triatomino, los parásitos se diferencian primero en amastigotes y posteriormente en epimastigotes (Fig. 3B). Después de varias rondas de duplicación, estos organismos migran y se adhieren en la pared de la porción final del intestino antes de cambiar a tripomastigotes metacíclicos. Estas células son excretadas junto con las heces y la orina del insecto vector al momento de alimentarse (Fig. 3C).

Incapaces de atravesar la piel intacta, los tripomastigotes metacíclicos entran al hospedero a través de lesiones en la piel (como la misma mordedura) ó bien por membranas mucosas. Una vez dentro del mamífero, *T. cruzi* es capaz de parasitar un gran número de células musculares, nerviosas y fagocíticas. En el

citoplasma del huésped se transforma al estadio amastigote (Fig. 3D), se replica y cuando el número de parásitos es elevado se diferencian en tripomastigotes sanguíneos (Fig. 3E), los cuales son liberados a la circulación después de la lisis de la célula hospedera (Fig. 3F). La infección del vertebrado perdura por la invasión a nuevas células. Finalmente, el ciclo biológico se cierra cuando un insecto de la familia Reduviidae se alimenta del mamífero contaminado con este protozoario (Fig. 3A; Tyler & Engman, 2001).

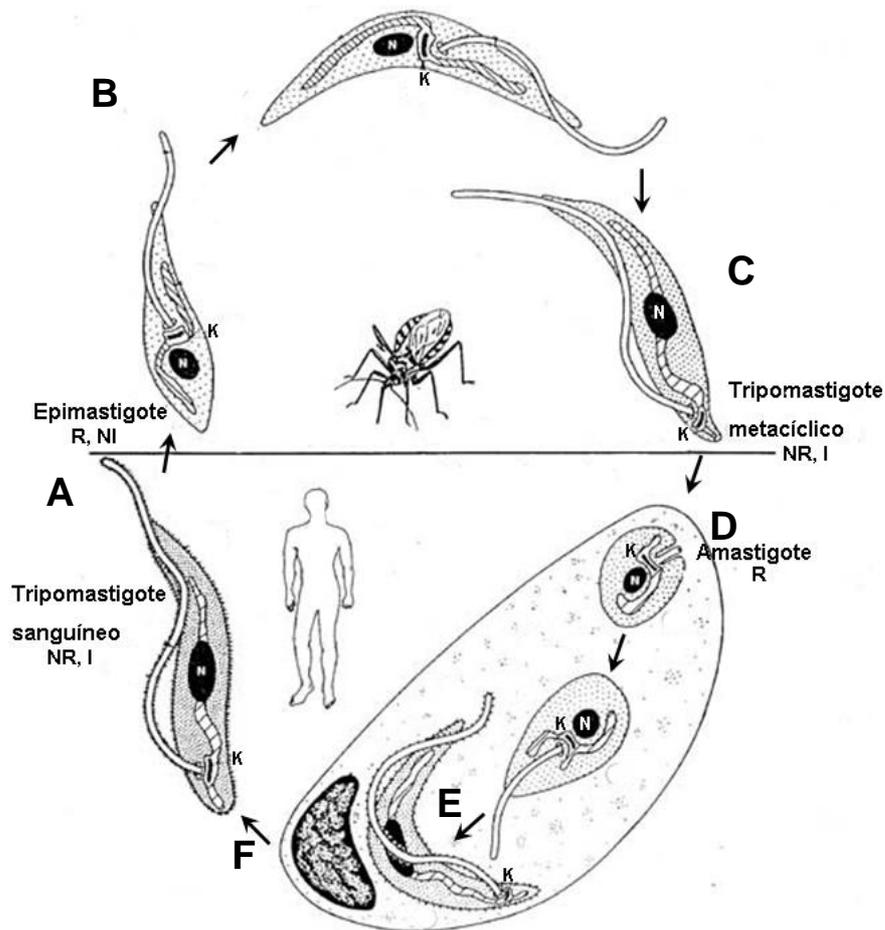


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*. A) Tripomastigote sanguíneo: estadio que es ingerido por un triatomino cuando se alimenta con la sangre de un mamífero contaminado. B) Epimastigote: forma replicativa presente en la porción media del tracto digestivo del vector. C) Tripomastigote metacíclico: estadio que invade un gran número de células una vez que ha ingresado al huésped. D) Amastigote: forma que se duplica activamente en el citoplasma de las células hospederas. E) Tripomastigote sanguíneo: estadio que se genera a partir de la diferenciación del amastigote. Cuando la célula es lisisada, son liberados (F) y estos parásitos pueden infectar nuevas células o bien ser ingeridos por un vector y el ciclo vuelve a comenzar. Ver detalles en el texto. R: replicativo; NR, no replicativo; I, infectivo; NI, no infectivo; N, núcleo; K, cinetoplasto. Modificado de [www.gefor.4t.com](http://www.gefor.4t.com)

Además de ser un patógeno importante, *T. cruzi* es un organismo interesante en la biología de los eucariontes. En este parásito, al igual que en otros tripanosomátidos, se han descrito mecanismos peculiares de expresión de genes que difieren de los dogmas establecidos en organismos superiores. Como ejemplos de esta situación puede citarse la edición del RNA mitocondrial, la presencia génica de unidades policistrónicas que agrupan decenas de genes codificadores de proteínas, el evento de splicing en *trans* como un mecanismo de maduración de RNA mensajeros (RNAm) y la existencia de unidades de transcripción ribosomal que poseen el gen 28S polifragmentado.

- **Edición de RNAm mitocondrial**

Uno de los ejemplos más interesantes de participación de RNAs pequeños sobre la expresión génica es la edición postranscripcional de los RNAm mitocondriales observada en los tripanosomas y leishmanias (Simpson et al., 2003; Stuart et al., 2005). Este mecanismo de cambio en la secuencia codificadora del RNAm involucra principalmente la inserción y, con menor frecuencia, la delección de uridinas en el transcrito primario. Estas modificaciones son catalizadas por complejos proteicos que poseen actividad enzimática de corte y ligación (Simpson et al., 2004) que son guiados específicamente a su secuencia blanco por moléculas pequeñas de aproximadamente 60 nucleótidos de largo denominadas RNAs “guía” (RNAg; Blum et al., 1990). Dichas partículas son indispensables para la selección correcta de la región de anclaje (formación del duplex RNAg-RNAm) y de la

zona de edición (reclutamiento del “editosoma” responsable) localizadas dentro del pre-RNAm (Blum et al., 1990; Reifur et al., 2010). Los RNAs guías están codificados principalmente en el DNA de maxicírculos del cinetoplasto.

Cabe destacar que en algunos casos más del 50% de los nucleótidos presentes en la cadena del RNAm maduro son producto de la edición y no de la transcripción del gen mitocondrial (Stuart et al., 1997). Además de la generación de marcos de lectura, los cambios por edición crean los codones de inicio y de término de la traducción de proteínas (por ejemplo: citocromo oxidasa; ATP sintasa), involucradas en procesos mitocondriales como lo es la fosforilación oxidativa (Stuart et al., 2005).

- **Generación de RNAm maduros nucleares en tripanosomátidos**

La descripción de la secuencia de DNA de tres cinetoplástidos parásitos paradigmáticos (*T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*) confirmó que la mayoría de los genes que codifican para proteínas están agrupados en unidades policistrónicas largas y en ocasiones bidireccionales (Martínez-Calvillo et al., 2003; El-Sayed et al., 2005; Haile & Papadopoulou, 2007). Además, ante la virtual ausencia de promotores tipo II (aquellos que dirigen la síntesis del RNAm), se ha sugerido que el inicio de la transcripción se lleva a cabo en una región específica de cada cromosoma (Martínez-Calvillo et al., 2004), que genes vecinos se encuentran separados uno del otro por regiones espaciadoras cortas (Helh & Roditi, 1994; Vanhamme & Pays, 1995) y que el complejo enzimático responsable de sintetizar potencialmente todo el pre-

RNA nuclear es la RNA polimerasa (Pol) II, sensible al fármaco  $\alpha$  amanitina (Campbell et al., 2003).

Los tripanosomas y las leishmanias generan mensajeros individuales, a partir de un transcrito precursor policistrónico, mediante dos eventos de procesamiento post-transcripcional: el splicing en *trans* y la poliadenilación (Teixeira, 1998; Radwanska et al., 2000; Jäger et al., 2007).

Con excepción del gen que codifica para la Poly (A) polimerasa (Mair et al., 2000), los pre-RNA de estos organismos son modificados en el extremo 5' por splicing en *trans*. Esta reacción produce la inserción de un bloque no codificador (referido como spliced leader ó miniexón), de 39 a 41 nucleótidos de largo, en regiones específicas localizadas de 30 a 100 nucleótidos “río arriba” del codón AUG iniciador para la traducción (Jäger et al., 2007). Estos elementos son similares a los que han sido descritos en intrones de pre-RNA de otros eucariontes, en donde el proceso de maduración está determinado por el splicing en *cis*: dentro del espaciador intergénico se localiza un tracto rico de pirimidinas que flanquea al dinucleótido AG, el cual, es utilizado como el sitio aceptor del miniexón (Mount, 1982; Huang & Van der Ploeg, 1991).

Una de las funciones del spliced leader es proporcionar al RNA el “cap”. En estos protozoarios parásitos es referido como “cap 4”, estructura altamente metilada formada por la universal m<sup>7</sup>Gppp y los cuatro nucleótidos adyacentes (m<sup>7</sup>Gpppm<sup>6,2</sup>AmpAmpCmpm<sup>3</sup>Um; Perry et al., 1987). Aparentemente, este motivo estructural participa en la estabilización del mensajero evitando su

degradación (Ullu & Tschudi, 1995) y favoreciendo el ensamblaje del ribosoma (Gao et al., 2005).

Por otro lado, el extremo 3' de todos los RNAm es modificado por la adición múltiple de residuos de adenina (poliadenilación). En los tripanosomátidos no ha sido posible identificar los motivos consenso que son reconocidos por la Poly (A) polimerasa. Una de las teorías mejor aceptadas sugiere que la poliadenilación está acoplada con el splicing en *trans*, ya que aparentemente solo se reconoce la distancia que existe entre el sitio aceptor del spliced leader (del gen río arriba) y la región donde se inserta la secuencia de poly(A) (Teixeria, 1998). Por ello se ha sugerido que las zonas de poliadenilación están localizadas de 100 a 300 nucleótidos “río arriba” de la señal de splicing en *trans* (Benz et al., 2005). Además del espaciamiento adecuado, está documentado que la presencia del tracto rico en pirimidinas es crucial para el correcto procesamiento del extremo 3' del mensajero vecino (Huang & Van der Ploeg, 1991; LeBowitz et al., 1993). Puede entonces concluirse que la poliadenilación de un mensajero es dependiente del splicing en *trans* del gen contiguo (LeBowitz et al., 1993; Matthews K et al., 1994).

La generación simultánea de cientos de RNAm nucleares en ausencia de promotores específicos para la Pol II limita al sistema génico a una regulación post-transcripcional de genes individuales (Clayton, 2002). Si bien todas las secuencias codificantes para proteínas presentes en la misma unidad policistrónica son transcritas inicialmente en proporciones similares, la abundancia de los mensajeros maduros correspondientes puede ser diferente.

Este mecanismo de control postranscripcional de la expresión génica parece involucrar principalmente elementos reguladores ubicados en el área no traducida del extremo 3', en menor grado ciertos motivos del 5', además de la actividad de un gran número de complejos enzimáticos (revisado por Clayton & Shapira, 2007).

- **Del DNA ribosomal al nucléolo**

Desde sus orígenes, el grupo de investigación al cual pertenezco tiene interés en estudiar la biología molecular y celular del sistema del RNAr de *T. cruzi*. A modo de una breve introducción considero pertinente redactar algunos aspectos relevantes de los genes ribosomales de otros eucariontes antes de describir la situación en nuestro modelo unicelular.

Las células somáticas de organismos superiores, además de levaduras, contienen decenas, cientos o, como en el caso de las plantas, miles de copias de DNAr arregladas como reiteraciones directas localizadas en uno o en más cromosomas (Reeder, 1992). Usualmente, los genes ribosomales (también llamados unidad de transcripción, cistrón ú operon) se estructuran por un segmento transcribible y por un espaciador intergénico (IGS) cuyo tamaño depende de la especie. Después de ser transcrita la región codificante, se genera un pre-RNAr, el cual es blanco de un extensivo procesamiento postranscripcional como lo son reacciones de metilación y de pseudouridilación de nucleótidos específicos, y el corte de los espaciadores internos y externos. Las moléculas que se forman de este proceso corresponden a las especies

maduras de RNAr (18S, 5.8S y 28S). Estas constituirán el soporte estructural y funcional de los ribosomas citoplásmicos (Fig. 4).

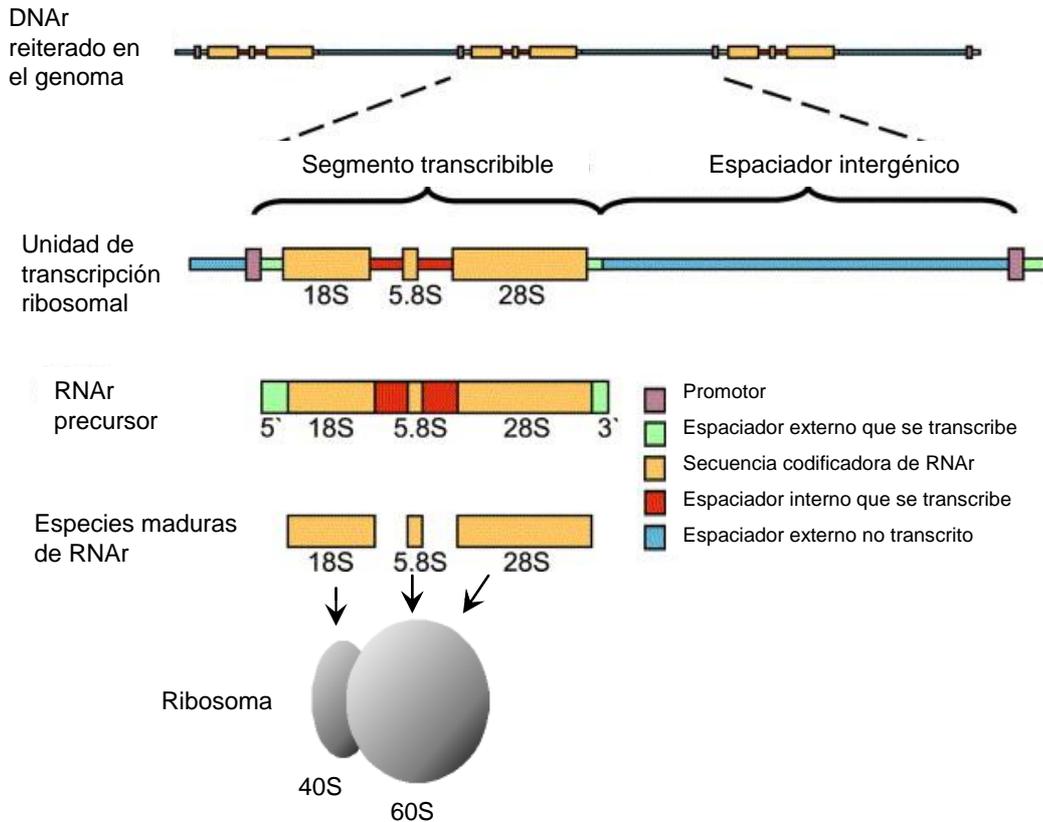


Figura 4. Sistema ribosomal general de humanos. A) El DNAr está arreglado en tandem en el genoma, en este ejemplo se ilustran tres unidades de transcripción continuas. B) Cistrón ribosomal individual formado por un segmento codificador y por un espaciador intergénico. C) Transcrito primario del RNAr sintetizado por la Pol I. D) Especies maduras de RNAr 18S, 5.8S y 28S. E) Un ribosoma que se forma por una subunidad pequeña (40S) la cual contiene al RNAr 18S más 33 proteínas, y por una subunidad mayor compuesta por los RNAr 5.8S y 28S, además del RNAr 5S (sintetizado por la Pol III) y 49 proteínas. Modificada de Raska et al., 2004.

Por su parte, la región intergénica es relevante debido a que contiene elementos reguladores en *cis* trascendentales, como lo son: el promotor génico, promotor espaciador, potenciadores (enhancers) y terminadores (Fig. 5).

Normalmente la arquitectura del promotor ribosomal, pero no así su secuencia nucleotídica, se encuentra conservada entre los organismos. Dos regiones

importantes han sido descritas detalladamente, el llamado dominio central o “core” que abarca el sitio de inicio de la transcripción (TSP) y un módulo de control “río arriba” (UCE). Ambos son indispensables y suficientes para la adecuada síntesis del pre-RNAr.

Sin embargo, los bloques adyacentes (arriba mencionados) pueden estimular la actividad promotora sin afectar la especificidad transcripcional (Fig. 5; Sollner-Webb & Mougey, 1991; Heix & Grummt, 1995; Grummt, 2003; Raska et al., 2004; Moss et al., 2007).

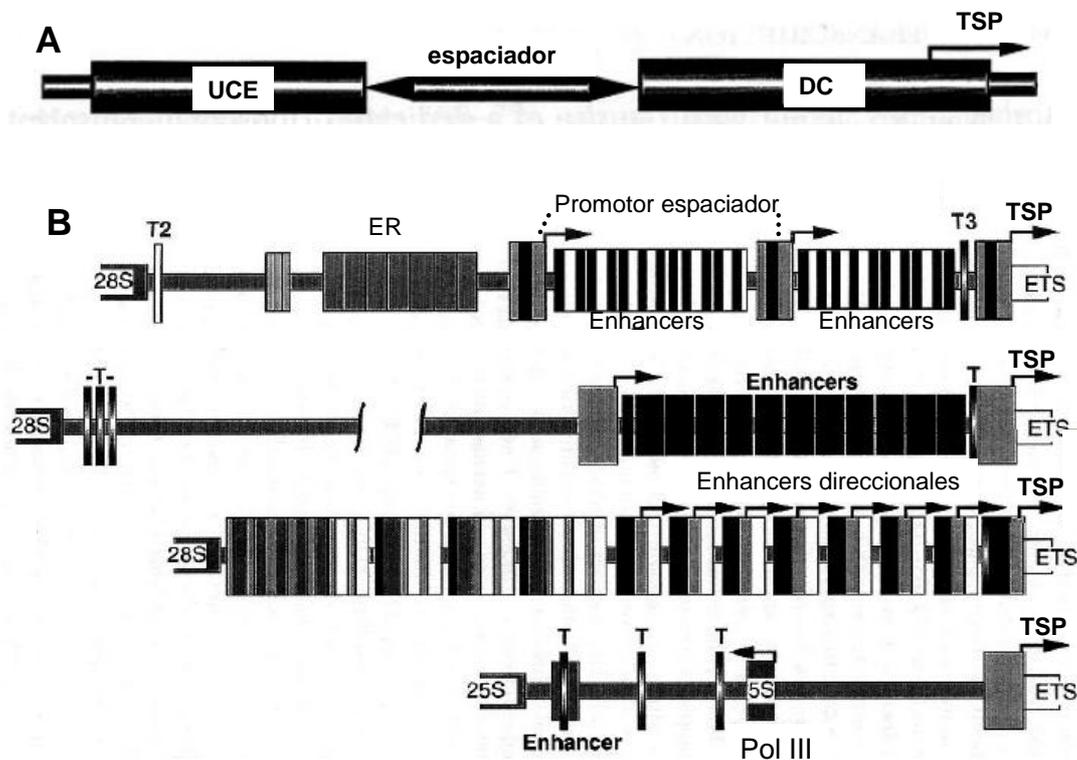


Figura 5. Elementos funcionales localizados en el espaciador intergénico del DNAr. A) Arquitectura típica de un promotor específico de la Pol I. La flecha indica el TSP. B) Elementos adicionales descritos en el IGS de varios organismos que pueden regular la transcripción del DNAr entre estos se encuentran: los enhancers, los promotores espaciadores, las secuencias repetidas (ER) y los terminadores de la transcripción (T). El TSP activo para la Pol I es indicado. ETS, Espaciador externo transcrito. En el caso de *S. cerevisiae* dentro del IGS se localiza el gen 5S que es transcrito por la Pol III. Modificada de Moss & Stefanovsky, 2007.

En humanos, la producción del pre-RNA<sub>r</sub> requiere la unión preliminar de factores proteicos reguladores sobre el promotor de los cistrones ribosomales que son transcripcionalmente activos. La interacción primaria la realizan la proteína UBF (upstream binding factor) y el factor de selectividad 1 (SL1) formado por TBP (tata binding protein) y cinco factores adicionales (TAF's, TBP associated factors); este ensamblaje molecular favorece la formación de un complejo de pre-iniciación.

Posteriormente, se recluta la RNA polimerasa I (Pol I) acompañada por un gran número de moléculas accesorias adicionales, como PAF53, TIF-IA, TTF-1, caseína cinasa 2 (CK2), actina, miosina, la topoisomerasa I y II $\alpha$ , TFIIH, entre otros. El ensamblaje correcto de cada uno de estos componentes asegura que la Pol I pueda salir del promotor y empezar en el nucleótido +1 la producción del RNA<sub>r</sub> precursor (Fig. 6; revisado por Drygin et al., 2010). Cabe destacar que uno de los principales mecanismos de regulación de los genes ribosomales activos, aunque no el único, es a nivel del inicio de transcripción (Moss et al., 2007).

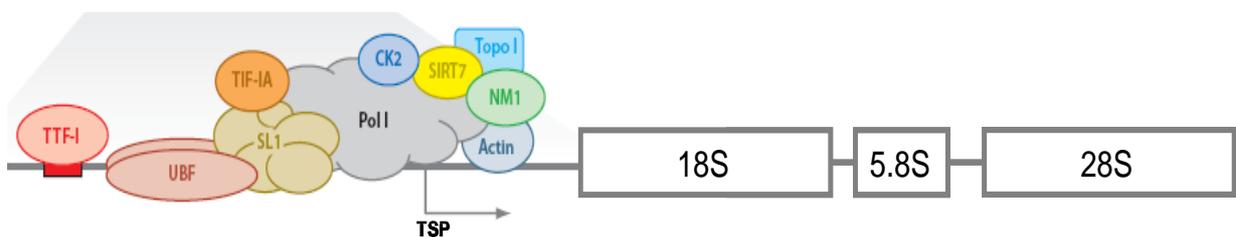


Figura 6. Pol I y sus factores proteicos accesorios. La Pol I es la enzima responsable de transcribir el DNA<sub>r</sub> en todos los eucariontes. Para realizar esta acción, la enzima requiere la presencia de un número elevado de proteínas. Ver detalles en el texto. Modificada de Drygin et al., 2010.

La acción enzimática de la Pol I representa la actividad transcripcional más importante, especialmente en células en división, donde puede generar más del 80% del RNA total, un enorme gasto metabólico celular. En la generación de las subunidades ribosomales participan los productos génicos de las tres polimerasas de RNA eucariontes: las especies maduras de RNAr 18S, 5.8S y 28S (Pol I), el RNAr 5S (Pol III) y aproximadamente 82 proteínas riosomales (Pol II; Hadjiolov, 1985; Scheer, Weisenberger, 1994; Hernandez-Verdun, 2006).

Este complicado proceso se realiza en el nucléolo (Fig. 7), un compartimento nuclear libre de membrana que es prominente y dinámico. El nucléolo se forma por un amplio número de interacciones proteína-proteína y proteína-ácidos nucleicos en zonas específicas de los cromosomas acrocéntricos. Estas son referidas como las regiones organizadoras nucleolares o NOR (Nucleolar Organizer Region) (Scheer, Weisenberger, 1994).

Cuando es analizado a nivel ultraestructural se puede observar que el nucléolo de células humanas (y de otros eucariontes superiores) en interfase está formado por tres subdominios morfológica y bioquímicamente diferentes.

l) Los centros fibrilares.- Regiones claras, frecuentemente circulares de 0.1 a 1µm de diámetro, enriquecidas con DNAr, RNA pol I, DNA topoisomerasa I y la proteína UBF (upstream binding factor; Fig. 7, \*).

II) El componente fibrilar denso.- Estructura compacta que contiene una alta concentración de moléculas ribonucleoproteicas que le confieren electrodensidad. Esta capa o borde rodea parcial o totalmente a los centros fibrilares y está compuesto por fibrilarina, nucleolina, U3 snoRNA y algunos factores de transcripción (Fig. 7; CFD).

III) El componente granular.- Zona constituida por gránulos de aproximadamente 15nm, donde se encuentran presentes B23/nucleofosmina, proteínas constitutivas de los ribosomas, factores de ensamble y también las subunidades 40S y 60S prácticamente maduras (Fig. 7, CG; Mèlèse & Xue, 1995; Scheer & Hock, 1999; Raska et al., 2006; Sirri et al., 2006; Hernandez-Verdun, 2010).

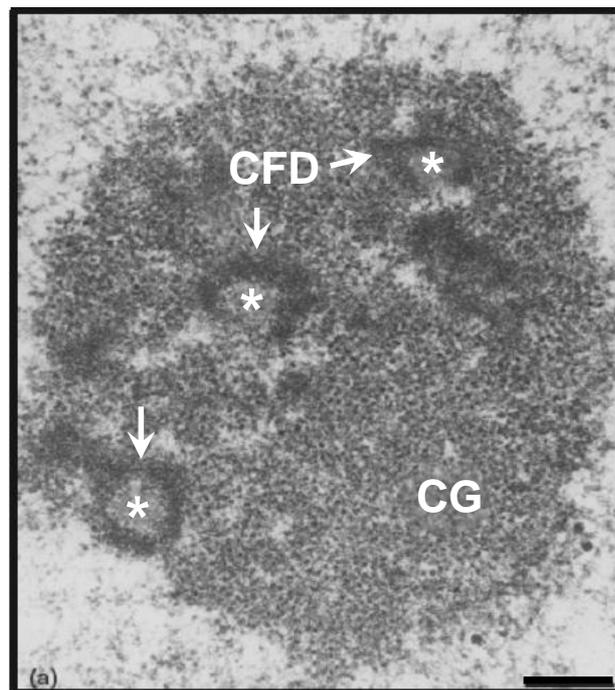


Figura 7. El nucléolo. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión del nucléolo de una célula HeLa. La arquitectura tripartita puede ser distinguida: los CFs (\*) están rodeados por el CFD (flechas blancas), ambas estructuras están embebidas en el CG. La barra indica 0.5 $\mu$ m. Modificado de Hernandez- Verdun et al., 2010.

La síntesis del pre-RNA<sub>r</sub> y el procesamiento temprano se realizan en la porción fibrilar del nucléolo, mientras que en el componente granular se lleva a cabo la maduración tardía y el ensamblaje de las partículas pre-ribosomales. Se ha sugerido que la biogénesis de ribosomas es un proceso vectorial que correlaciona con la disposición espacial del nucléolo (Cmarko et al., 2000; Koberna et al., 2002; Huang, 2002). Es importante resaltar que el número, el tamaño y la composición del nucléolo dependen del tipo celular y de las condiciones fisiológicas de un momento determinado (Warner, 1990).

Por otro lado, un número creciente de evidencias indican que el nucléolo es una entidad multifuncional que participa en la regulación de eventos celulares adicionales como son: progresión del ciclo celular, mitosis y proliferación, respuesta al estrés, biogénesis de múltiples partículas ribonucleoproteicas no ribosomales, apoptosis y formación de los telómeros (revisado por Pederson, 1998; Boisvert et al., 2007; Pederson, 2011).

El concepto de un nucléolo plurifuncional es reforzado por la descripción del proteoma nucleolar humano, el cual está formado por más de 700 moléculas. La clasificación basada en la actividad desempeñada por cada proteína nucleolar, indica que aproximadamente un 30% poseen un papel relacionado con la producción de los ribosomas; el porcentaje restante participa en fenómenos celulares diversos (Fig. 8) e incluso se han localizado moléculas de las cuales aún se desconoce el papel celular en el que están involucradas (Fig. 8; Andersen et al., 2002; 2005; Boisvert et al., 2007).

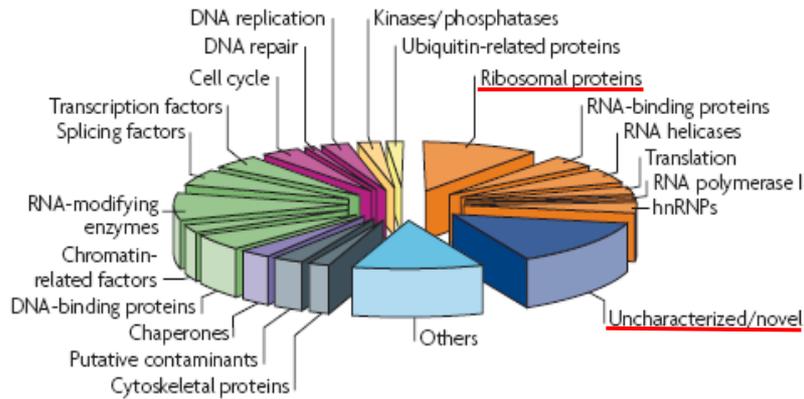


Figura 8. El proteoma nucleolar humano. Se han descrito aproximadamente 700 proteínas que se localizan en un momento determinado en el nucléolo. De estas, solamente el 30% participan en la biogénesis ribosomal (sección anaranjada). En la gráfica se observa la amplia gama de funciones en las que las proteínas nucleolares intervienen. Modificada de Boisvert et al., 2007.

- **Sistema ribosomal de *T. cruzi***

En el caso particular de *T. cruzi*, se ha observado la existencia de unidades de transcripción ribosomal atípicas (Fig. 9). En este protozoario, el DNAr está formado por una región codificante de aproximadamente 10kb y por un espaciador intergénico largo, cercano a las 20kb (Hernández et al., 1988, Hernández & Castañeda, 1983). El cistrón ribosomal está reiterado en el genoma, el número de copias estimado oscila alrededor de las 100 (Castro et al., 1981) localizadas en al menos dos cromosomas (Wagner & So, 1990). La diferencia principal con los eucariontes superiores radica en que en *T. cruzi* el RNAr 28S se encuentra fragmentado en dos especies grandes y cuatro pequeñas, alternadas por cinco separadores internos que forman parte del RNAr precursor (Fig. 9; Castro et al., 1981; Hernández et al., 1983; Hernández et al., 1988).

El arreglo de las regiones codificadoras de RNAr dentro de la unidad fundamental fue determinado y se observó que cada una de estas se presenta como un módulo diferente e independiente ordenados de la siguiente manera: 18S, S3, 24S $\alpha$ , S1, 24S $\beta$ , S2, S6, S4 (Fig. 9)

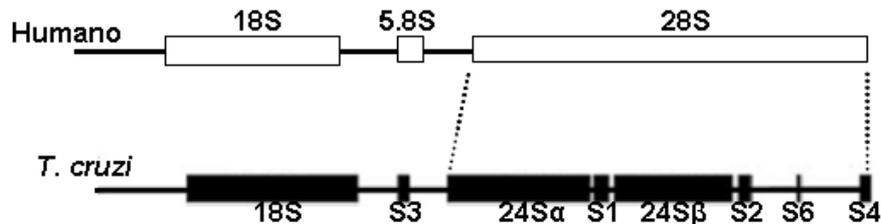


Figura 9. Organización de los genes de RNAr de *T. cruzi*. Los bloques representan los futuros RNAr maduros. S3 corresponde al RNAr 5.8S de otros eucariontes. En los tripanosomátidos el gen 28S está formado por dos RNAr grandes (24S $\alpha$  y 24S $\beta$ ) y por cuatro RNAr menores (S1, S2, S4 y S6). Las especies pequeñas fueron clasificadas de acuerdo a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida y la nomenclatura "S" es en referencia a pequeño (small). La región transcribible del DNAr humano fue incluida para resaltar la discontinuidad del gen 28S de *T. cruzi*.

La síntesis del precursor ribosomal, catalizado por la Pol I, está bajo el control de elementos *cis*-reguladores bien definidos. Bajo este contexto, inicialmente se describieron dos regiones promotoras del DNAr, una proximal y otra distal (Dietrich et al., 1993; Martínez-Calvillo & Hernández, 1994, Tyler-Cross et al., 1995; Martínez-Calvillo et al., 1997). Inicialmente se observó que ambos bloques tenían actividad estimulante. Sin embargo, las construcciones génicas donde se caracterizó el llamado promotor proximal siempre incluyeron las secuencias del elemento distal. Esta controversia parece haber sido resuelta en estudios posteriores ya que se encontró que la síntesis de RNAr está controlada mayoritariamente, quizá totalmente, por el promotor distal descrito en nuestro laboratorio (Figueroa-Angulo et al., 2003).

El análisis fino de esta región permitió identificar al menos cinco bloques de secuencia potencialmente reguladores: a) módulos repetidos aumentadores cortos (Fig. 10, ER; Pulido et al., 1996); b) el elemento de control “río arriba” (UCE) de la región del TSP; c) una secuencia represora “corriente abajo” (R) del TSP; d) una región activadora “río abajo” (RA) del represor; y e) la zona de inicio de transcripción acotada a sólo siete nucleótidos (Fig. 10; Figueroa-Angulo et al., 2003; 2006).

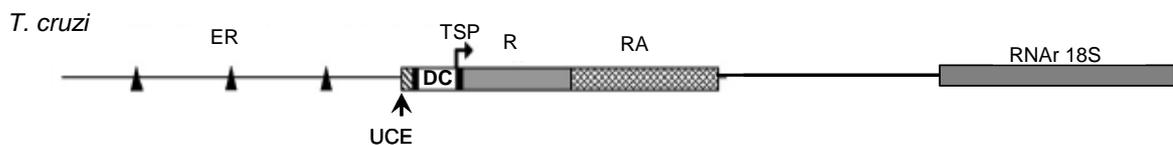


Figura 10. Elementos funcionales localizados en el IGS del DNAr de *T. cruzi*. Dentro de la secuencia de IGS se encuentran regiones que pueden participar en la regulación de la transcripción del DNAr. El promotor génico está estructurado por un dominio central (DC) y por el UCE. El TSP es indicado con la flecha. El gen 18S es ilustrado, la región codificante del 5.8S y 28S fragmentado no se muestran. (▲) ER; elemento repetido; R, represor; RA, región estimuladora. Modificado de Figueroa de Figueroa-Angulo et al., 2006.

Como sucede en otros eucariontes, en los tripanosomas la biogénesis de ribosomas se realiza en el nucléolo. El análisis ultrafino del núcleo de estos organismos, en la interfase del ciclo celular, reveló que la estructura nucleolar es única y esférica. En *T. cruzi* el nucléolo tiene un volumen aproximado de  $0.7\mu\text{m}^3$  (López-Velázquez et al., 2005) y en *T. brucei* un diámetro que oscila entre 0.5 a  $1\mu\text{m}$  (Ersfeld et al., 1999). También se observó que el nucléolo de estos tripanosomátidos tiene una organización bipartita en la que están presentes un componente fibrilar denso y un componente granular; sin la aparente existencia de los centros fibrilares (Ogbadoyi et al., 2000; López-Velázquez et al., 2005).

La ausencia de este subdominio nucleolar es común en un vasto número de células de diferentes especies; de hecho, los nucléolos tripartita parecen ser exclusivos de vertebrados que emplean saco amniótico en su desarrollo embrionario (Thiry & Lafontaine, 2005). La información de la composición bioquímica de la estructura nucleolar de los tripanosomas es poca, sin embargo, por estudios de hibridación *in situ* fluorescente e inmunofluorescencia se ha reportado que los genes ribosomales, la subunidad mayor de la Pol I y las proteínas Nopp 140 y Nopp44/46 se localizan en el nucléolo de *T. brucei* (Parson et al., 1994; Navarro et al., 2007; Daniels et al., 2010). Por último, la participación del nucléolo en procesos celulares no relacionados con la generación de ribosomas no ha sido descrita en *T. cruzi*.

## 2. ANTECEDENTES

Es generalmente aceptado que la fase estacionaria de epimastigotes en cultivo representa las condiciones tempranas para la diferenciación hacia el estadio tripomastigote metacíclico (infectivo, no proliferativo; Camargo, 1964), forma del parásito donde hay ausencia de transcripción y desensamblaje del nucléolo (Elias et al., 2001).

Desde sus orígenes, el grupo de investigación al cual pertenezco tiene interés en estudiar la biología molecular y celular del sistema del RNAr de *T. cruzi*. Observaciones no publicadas de nuestro laboratorio indican que durante la fase estacionaria del cultivo los parásitos presentan una escasa tasa de síntesis de RNA. Dado que en *T. cruzi*, la mayor proporción del RNA que se genera corresponde al RNAr (Elias et al., 2001), cabe la posibilidad de sugerir que principalmente el sistema génico ribosomal global se esté regulando negativamente en epimastigotes bajo situaciones de estrés nutricional como lo es la propia fase estacionaria del cultivo.

### 3. OBJETIVOS

- Analizar la ultraestructura del nucléolo de epimastigotes de *T. cruzi* a lo largo de la curva de crecimiento
- Evaluar la tasa de transcripción en epimastigotes de *T. cruzi* durante la fase exponencial y la fase estacionaria del cultivo.
- Evaluar la existencia de interacciones potenciales entre los factores proteicos específicos de la Pol I con el promotor del DNAr de *T. cruzi*.

#### 4. MÉTODOS

- Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

Epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CL Brener) fueron cultivados en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) complementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomycin y 10mg/mL de hemina, a una temperatura de 28°C (Camargo, 1964). El número de células se registró diariamente utilizando una cámara Neubauer. Bajo los estándares de nuestro laboratorio, se ha definido que la fase exponencial corresponde al punto del cultivo que tiene una densidad de entre 8-10 millones de células/mL y que la fase estacionaria comienza 72h posteriores a la última replicación celular.

- Diferenciación *in vitro* de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos

Los epimastigotes de la fase exponencial del cultivo en medio LIT fueron re-inoculados en medio M-16 (0.4% NaCl, 0.04% KCl, 0.8% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% glucosa, 0.125% triptosa) complementado con 2.5% (v/v) de suero bovino fetal (Astolfi et al., 1984). Los parásitos se mantuvieron durante varios días a 28°C y la diferenciación celular fue evaluada diariamente por microscopía óptica.

- Tratamiento con cicloheximida (CHX)

Epimastigotes en la fase exponencial del cultivo en LIT fueron cosechados y resembrados en medio LIT fresco que contenía 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CHX (Tittawella et al., 2003). Las células se mantuvieron a 28°C y se obtuvieron muestras en los días 1, 2 y 3 posteriores a la inoculación. El efecto de la CHX se evaluó por microscopía óptica y microscopía electrónica.

- Ensayos de transcripción (nuclear run on assay)

Se obtuvieron  $2 \times 10^8$  epimastigotes de la fase exponencial o de la estacionaria de cultivo en medio LIT. Las células se lavaron dos veces con solución de fosfatos, se resuspendieron en 10mL de solución de lisis que contiene 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 3mM  $\text{CaCl}_2$ , 2mM  $\text{MgCl}_2$  y, posteriormente se agregó NP-40 a una concentración final de 0.5% (v/v). Los núcleos fueron aislados por centrifugación (1400 xg) y lavados una vez con buffer de lisis. La elongación del RNA se realizó al resuspender los núcleos en 100 $\mu\text{L}$  de 100mM Tris-HCl (pH 7.5), 25% glicerol (v/v), 0.15mM espermina, 0.5mM espermidina, 2mM DTT, 40U RNasin, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 4mM  $\text{MnCl}_2$ , 50mM NaCl, 50mM KCl, 2mM ATP, 2mM CTP, 2mM GTP, 10 $\mu\text{M}$  UTP, 125 $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-UTP (3000Ci/mmol). La suspensión fue incubada a 26°C durante 2, 4, 6, 10 y 20min. Al término de cada tiempo se obtuvieron 5 $\mu\text{L}$  de la mezcla y la elongación del RNA se detuvo al precipitar las macromoléculas con ácido tricloroacético al 10% (v/v) a 4°C. Las muestras fueron filtradas por vacío y la incorporación de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-UTP fue

determinada en el contador de centelleo (BECKMAN COULTER, modelo LS 6500).

- Microscopía electrónica de transmisión

Se obtuvieron epimastigotes, de los tiempos y cultivos mencionados, los cuales fueron lavados dos veces con solución de fosfatos pH 7.2 y fijados con glutaraldehído al 2.5% (v/v) durante dos horas a 4°C. Posteriormente el paquete celular se lavó tres ocasiones con solución de fosfatos por 10 minutos y se post-fijó con tetraóxido de osmio al 1% (v/v) a temperatura ambiente. Las muestras fueron deshidratadas con series graduales de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) y posteriormente tratadas con óxido de propileno. Los parásitos se pre-incluyeron en una mezcla de resina EPON y óxido de propileno en proporción 1:1. Al término, las muestras se incluyeron en la resina EPON. La polimerización se hizo a 60°C durante 24h. Se realizaron cortes ultrafinos de 50-60nm que fueron contrastados con acetato de uranilo al 4% (w/v) por 20 min y citrato de plomo al 3% (w/v) durante 10 min. La ultraestructura de *T. cruzi* fue observada bajo un microscopio electrónico (Jeol JEM 1010) y las imágenes se capturaron con una cámara MTI (modelo CCD-300-RC).

- Determinación del tamaño del nucléolo

Para estimar el área aproximada del nucléolo de *T. cruzi*, se obtuvieron imágenes digitales del núcleo celular. Se determinó el área y perímetro del nucléolo (cuerpo prominente, electrodensos y fibrogranular localizado en posición central o ligeramente orientado hacia un polo del núcleo) con el programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

- Ensayos de retardo (EMSA)

a) Obtención del extracto proteico nuclear

Se cosecharon epimastigotes de fase logarítmica o de fase estacionaria por centrifugación a 4500 xg por 10min a 4°C, las células fueron lavadas un par de veces con solución de fosfatos pH 7.2 frío. El precipitado celular fue resuspendido en ocho volúmenes (tomar como referencia el tamaño del paquete) de solución A que contiene 10mM Hepes (pH 7.9), 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM ditioneitol, 0.5mM fenilmetilsulfonil fluoruro, y fue almacenado durante 30 o 40 min a 4°C. Después las células fueron centrifugadas a 5400 xg por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue desechado y la pastilla fue resuspendida en cinco volúmenes de solución A más 2mM benzamidina, 5µg/mL aprotinina, 5µg/mL pepstatina A, 5µg/mL leupeptina. La suspensión fue transferida a un homogenizador de teflón (Wheaton) y los parásitos fueron lisados mecánicamente, proceso que fue verificado bajo el microscopio óptico. El homogenado celular se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5mL y fue

centrifugado 3300  $xg$  por dos minutos a 4°C. Los núcleos se resuspendieron en 100 $\mu$ L de solución C que contiene 20mM Hepes (pH 7.9), 0.42M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.5mM ditioneitol, 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 2mM benzamidina, 5 $\mu$ g/mL aprotinina, 5 $\mu$ g/mL pepstatina A, 5 $\mu$ g/mL leupeptina y fueron mantenidos en agitación suave durante 40min a 4°C. La suspensión fue centrifugada a 17000  $xg$  por 15min a 4°C y el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su utilización. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford.

#### b) Marcaje radiactivo del DNAr

Se utilizó el inserto 8-2A ligado en PUC18 que corresponde a un fragmento del promotor distal del DNAr que tiene un tamaño de 64 pares de bases que incluye el TSP. Fueron marcados radiactivamente, en el extremo 5', 400ng de este DNAr con 50 $\mu$ Ci de adenosina 5' - [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] - trifosfato (6000Ci/mM). La reacción de marcaje se realizó a 37°C por 30min, al término, fueron agregados 2 $\mu$ L de una solución de 0.5M EDTA. Se efectuó una extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y la fase acuosa se colocó sobre una columna de Sephadex G-50 para eliminar los nucleótidos no incorporados. Las cuentas por minuto fueron determinadas en el contador de centelleo (BECKMAN COULTER, modelo LS 6500).

### c) Interacción DNAr-proteína nuclear

En un tubo Eppendorf fueron mezclados 6µg de extracto proteico de núcleos aislados, 1µg de poly dl-dC y 5µL de una solución de interacción que contiene 5mM Hepes (pH 7.9), 80mM NaCl, 0.5mM ditioneitol, glicerol 20% (v/v), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM espermidina y se mantuvieron a 4°C por 10min. Posteriormente, se agregaron 50,000cpm (aproximadamente 0.2ng) del fragmento de 64 pares de bases radiactivo y la mezcla fue mantenida a 4°C por 20min. Al término, se adicionaron 6µL de solución de carga que contiene 0.25% azul de bromofenol (w/v), 0.25% xilen cianol (w/v), glicerol 50% (v/v) y los complejos DNA-proteína fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 4.5%. La separación electroforética se llevo a cabo a 150V durante 1h con 50 min en solución de TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 0.5X. Al término, el gel fue secado a 50°C durante 30min y expuesto por 24h en una pantalla el casete BAS 2040 Fujifilm. Las imágenes fueron obtenidas en el equipo FX analizador de imágenes (Bio rad).

## 5. RESULTADOS

- **Crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo**

El cultivo axénico de epimastigotes en medio LIT ofrece una herramienta apropiada para generar conocimientos básicos de la biología molecular y celular de un eucarionte. Cuando son cultivados, estos parásitos pasan por un período de crecimiento exponencial seguido de una etapa de transición logarítmica antes de llegar a la fase estacionaria, en la cual las células no se replican (Fig 11). El inoculo inicial fue de un millón de parásitos por mililitro de cultivo. La densidad celular se incrementó conforme transcurrió el tiempo y alcanzó un máximo de entre 70 y 80 millones de células por mililitro (Fig. 11). Durante esta etapa se observaron los cambios característicos de la morfología de los epimastigotes y un 5% de diferenciación al estadio tripomastigote metacíclico como ha sido descrito (Camargo, 1964). La re-inoculación de epimastigotes envejecidos en medio LIT fresco reactiva el proceso de duplicación celular pero con una cinética de crecimiento lenta (Fig. 11).

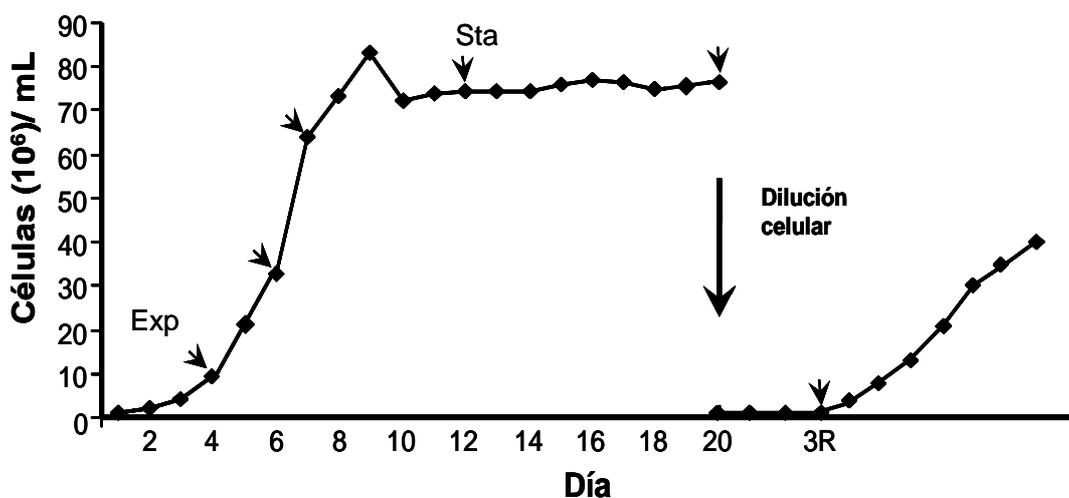


Figura 11. Curva de crecimiento de epimastigotes en cultivo. Son indicadas las fases exponencial (Exp) y la estacionaria (Sta). Las flechas pequeñas señalan los tiempos en los que se obtuvieron muestras para realizar algún ensayo. La re-inoculación de parásitos envejecidos se realizó 20 días post-inoculación.

- **Transcripción *in vitro***

La biogénesis ribosomal es un proceso celular que requiere de los productos finales de la actividad nuclear de las Pol I, II y III y está fuertemente ligado con el estatus de replicación y la disponibilidad de nutrientes (Drygin et al., 2010). Para comparar la tasa de transcripción en epimastigotes sometidos a distintas condiciones de proliferación, se realizaron experimentos de transcripción *in vitro* de tipo “nuclear run on assay” en una suspensión de núcleos extraídos de parásitos de los días 4 (fase exponencial) y 12 (fase estacionaria; Fig. 11). Después de la precipitación de las macromoléculas, se determinó la incorporación de  $^{32}\text{P}$ -UTP en el transcrito nascente. Como se puede apreciar en la Figura 12, la transcripción (evaluada por el marcaje radiactivo del RNA) es significativamente menor en células de la fase estacionaria en comparación con lo observado en células que proliferan activamente (Exp; Fig. 12).

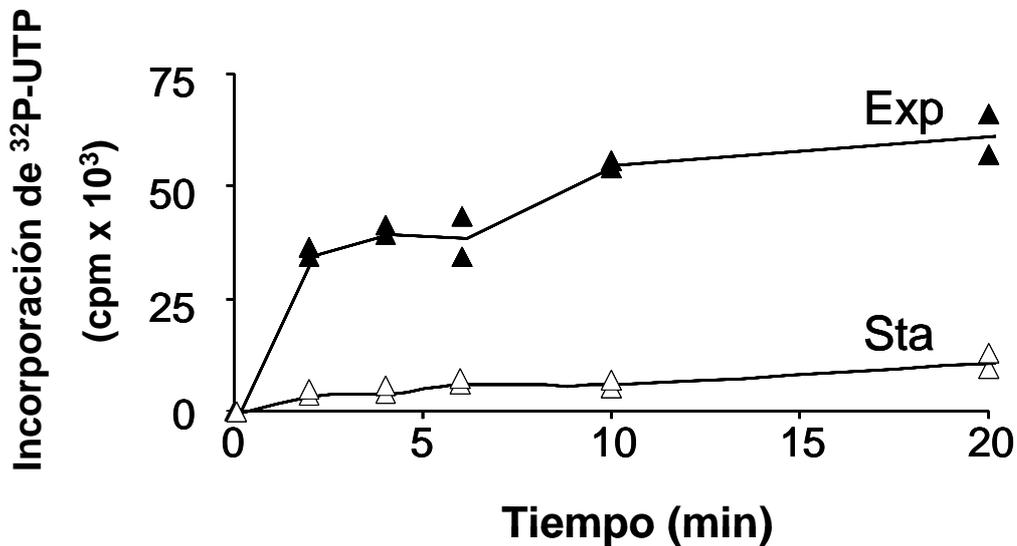


Figura 12. Reducción de la actividad transcripcional en epimastigotes de la fase estacionaria del cultivo. La incorporación de UTP radiactivo en función del tiempo en el RNA nascente es significativamente mayor en preparaciones de núcleos aislados obtenidos de parásitos de fase exponencial ( $\blacktriangle$ Exp) que la encontrada en la fase estacionaria ( $\triangle$ Sta). Cada medición se realizó por duplicado.

- **Microscopía electrónica**

Se ha descrito que la mayor proporción de la transcripción en *T. cruzi* está dedicada a la generación del RNA ribosomal (Elias et al., 2001), el cual es sintetizado en el nucléolo. Para explorar los efectos potenciales sobre el tamaño y/o la estructura nucleolar que acompañan a la disminución de la síntesis de RNA observada, se obtuvieron epimastigotes de diferentes etapas de crecimiento y su ultraestructura fue analizada por microscopía electrónica.

La primera visualización resaltable fue que el número de parásitos que poseen un nucléolo (definido como un dominio nuclear único, fibrogranular y electrodens; López-Velázquez et al., 2005) se reduce gradualmente a medida que los nutrientes son consumidos y que el cultivo se acerca al período donde no hay replicación (Fig. 13A). Un hallazgo interesante fue la presencia de organismos (aproximadamente un 30%) de la fase estacionaria temprana (día 12) y tardía (día 20) con nucléolo (Fig. 13A). Notablemente, la resiembra de estas células envejecidas en medio LIT recién preparado produce un aumento en la cantidad de parásitos con una estructura nucleolar con las características arriba mencionadas (Fig. 13A, columna 3R).

Posteriormente, se obtuvieron fotografías de microscopía electrónica de transmisión del núcleo de los epimastigotes y el área aparente del nucléolo fue estimada con el programa computacional ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Los datos obtenidos indican que el nucléolo de parásitos de la fase exponencial del cultivo tiene un tamaño cercano a las  $0.6\mu\text{m}^2$ , el cual se va reduciendo

paulatinamente hasta llegar a una estructura de alrededor de las  $0.2\mu\text{m}^2$  en células de la fase estacionaria temprana y tardía (Fig. 13B y 14). La reinoculación de este tipo de parásitos en medio LIT fresco correlaciona con un incremento en el tamaño del nucléolo y una reestructuración de sus dos componentes (Fig. 13B y 14).

Adicionalmente, encontramos que el núcleo de los epimastigotes que crecen activamente tiene forma circular y contiene cúmulos pequeños de heterocromatina localizados en la periferia (Fig. 14). En los parásitos que no se replican, este tipo de arquitectura cambia, se observa un núcleo amorfo y una cantidad elevada de cromatina compacta que ocupa un espacio significativo del nucleoplasma (Fig. 14).

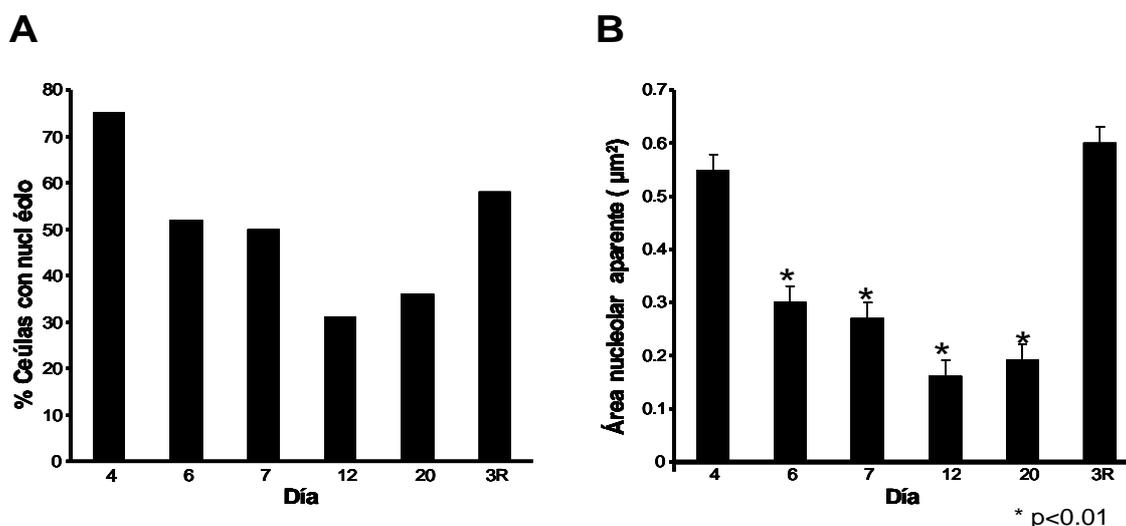
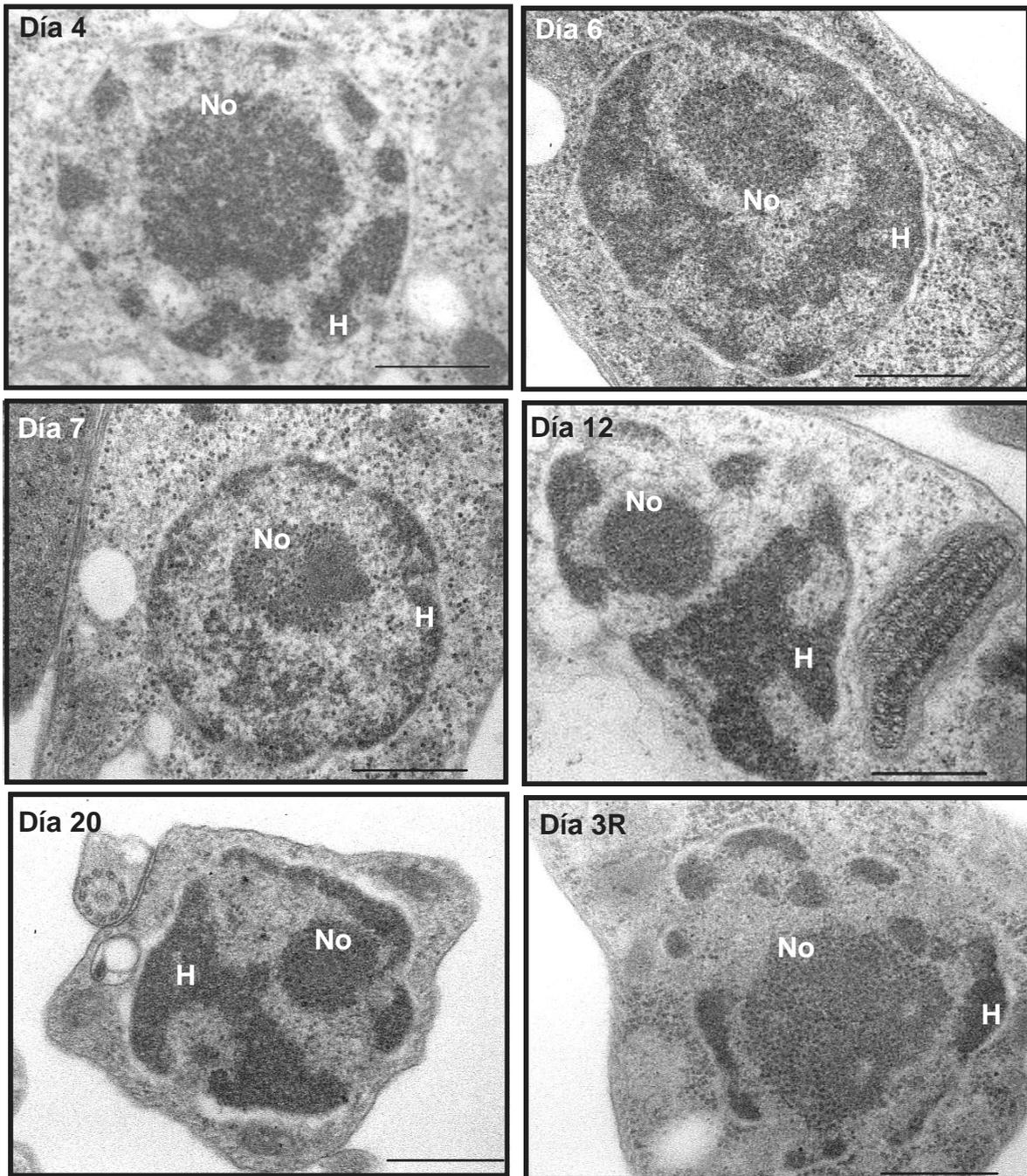


Figura 13. El mantenimiento y el tamaño del nucléolo correlacionan con el estado de proliferación. A) El porcentaje de epimastigotes que presentan una estructura nucleolar definida disminuye a medida que el tiempo avanza y los nutrientes son consumidos. La re-inoculación de parásitos envejecidos produce un incremento de epimastigotes con nucléolo (3R). El número de fotografías de microscopía electrónica de campos completos elegidos al azar fue en promedio diez. B) La reducción del tamaño del nucléolo correlaciona con el transcurso del tiempo y el agotamiento de nutrientes. Cuando los epimastigotes se resiembran en medio LIT fresco el tamaño del nucléolo se incrementa significativamente. El área se estimó utilizando el programa ImageJ. El número de fotografías promedio para cada condición fue de 30. (\*) indica diferencias significativas entre el tamaño del nucléolo del día 4 vs 6, 7, 12 y 20. No existen diferencias entre el día 4 y la columna 3R.



**Barra, 0.5µm**

Figura 14. El nucléolo de epimastigotes en cultivo. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión en las que se observa la reducción del tamaño aparente de la estructura nucleolar en los diferentes días del cultivo. También puede notarse que la heterocromatina presenta una localización periférica en las células que crecen activamente, en cambio, en los parásitos de fase estacionaria (días 12 y 20) la heterocromatina ocupa un área mayor del nucleoplasma. La re-inoculación de epimastigotes envejecidos en medio LIT fresco revierte la reducción del tamaño del nucléolo y la cantidad de heterocromatina en el núcleo. H, heterocromatina; No, nucléolo. La barra indica 0.5µm.

Además de la reducción del tamaño del nucléolo, se observó que la morfología y la distribución de los dos componentes nucleolares eran diferentes. El nucléolo de las células que se duplican exponencialmente está constituido por un componente granular (GC) que en proporción representa el elemento mayoritario y por un componente fibrilar denso (DFC) de menor tamaño; este tipo de arquitectura es indicativa de una generación elevada de las partículas pre-ribosomales (Fig. 15, paneles superiores). En cambio, en los organismos de la fase estacionaria, el territorio nucleolar que ocupa cada uno de los componentes no puede ser establecido con certeza (Fig. 15, paneles inferiores). Además, en estos parásitos existe una reducción considerable del espacio nuclear que ocupa el GC en condiciones de proliferación activa.

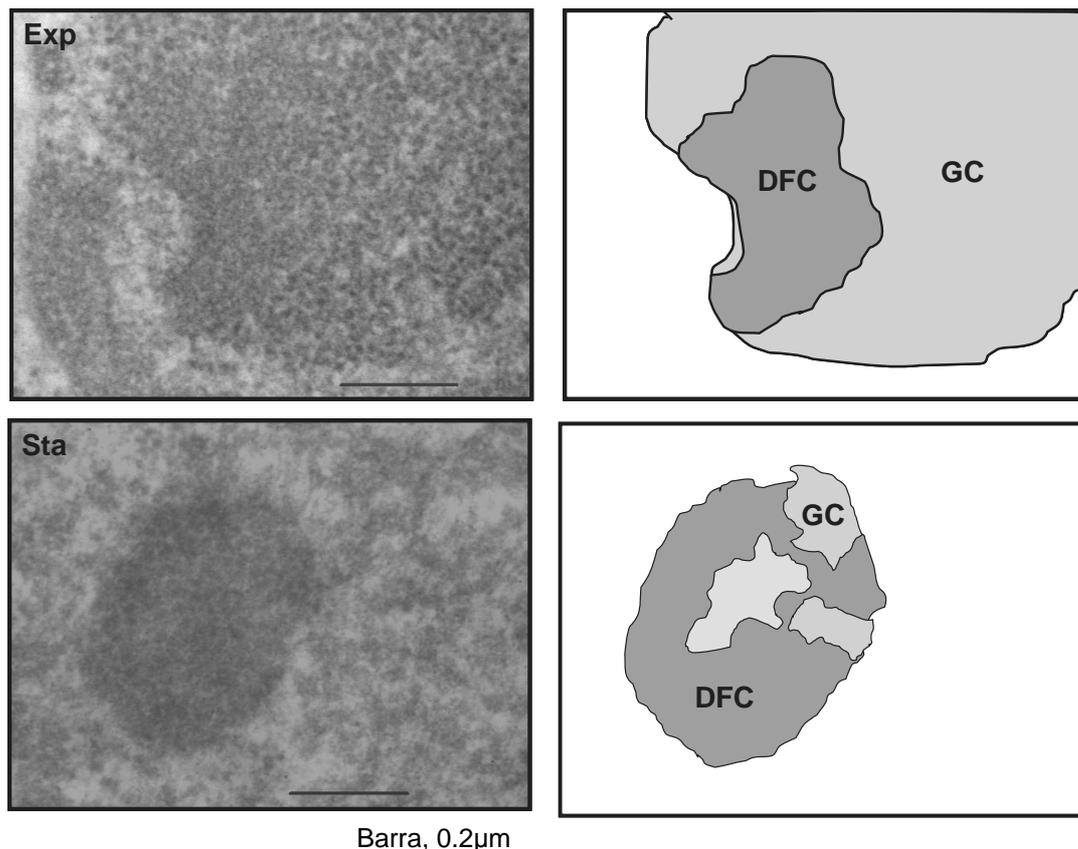


Figura 15. La arquitectura nucleolar de epimastigotes en cultivo. Fotografías de microscopía electrónica de transmisión (panel izquierdo) y su esquema correspondiente (panel derecho) derivadas de células de la fase exponencial (Exp) o de la estacionaria (Sta). Adicionales a la reducción del tamaño del nucléolo, se pueden observar los cambios en la distribución aparente de cada componente. La barra indica 0.2µm.

La CHX es un inhibidor de la síntesis de proteínas. En otras células eucariontes se ha observado que interfiere negativamente en la transcripción del DNAr, en el procesamiento del pre-RNAr (Higashia et al., 1968) y produce el desensamblaje del nucléolo (Ghosh & Pawelets, 1994).

Para evaluar el efecto de este fármaco sobre la proliferación celular, la síntesis de RNA y el tamaño del nucléolo de epimastigotes de *T. cruzi*, un cultivo de parásitos "primario" creciendo exponencialmente fue diluido y dividido en tres porciones. A la primera parte se le añadió CHX, a la segunda el diluyente, y la tercera es el control. El cultivo tratado con etanol presentó un crecimiento celular similar al de los parásitos control, mientras que claramente la presencia de CHX inhibió la duplicación de los epimastigotes (Fig. 16).

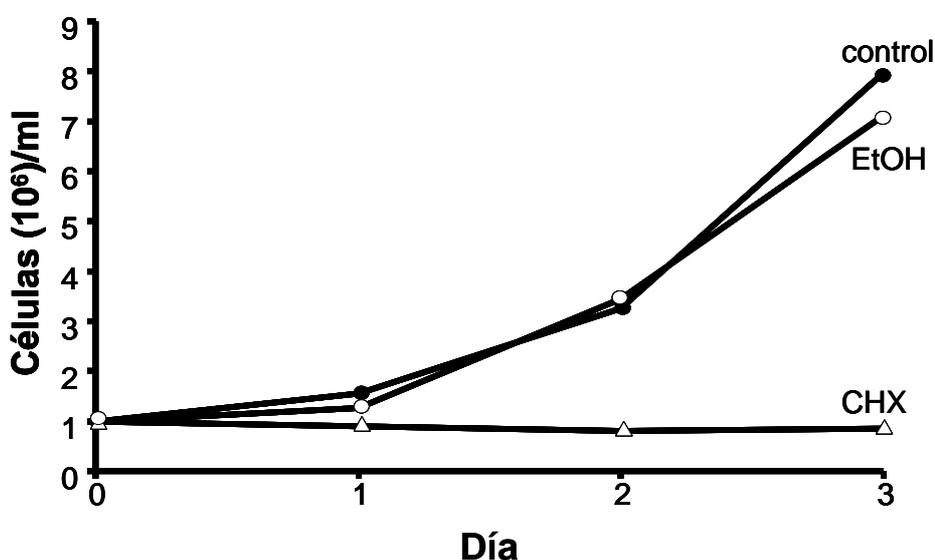


Figura 16. Inhibición del crecimiento de epimastigotes en cultivo por CHX. Se inocularon un millón de parásitos en medio LIT (●control); en LIT más etanol (○ EtOH) y en LIT más CHX (△ CHX) y se observó duplicación celular en todas las condiciones excepto en los epimastigotes tratados con este antibiótico. El efecto inhibitorio de la CHX sobre el crecimiento fue confirmado en ensayos independientes posteriores.

Después de 24 horas de la administración de CHX, encontramos que la incorporación de  $^{32}\text{P}$ -UTP en el RNA naciente fue aproximadamente cinco veces menor en comparación con lo observado en núcleos extraídos de las células control (Fig. 17).

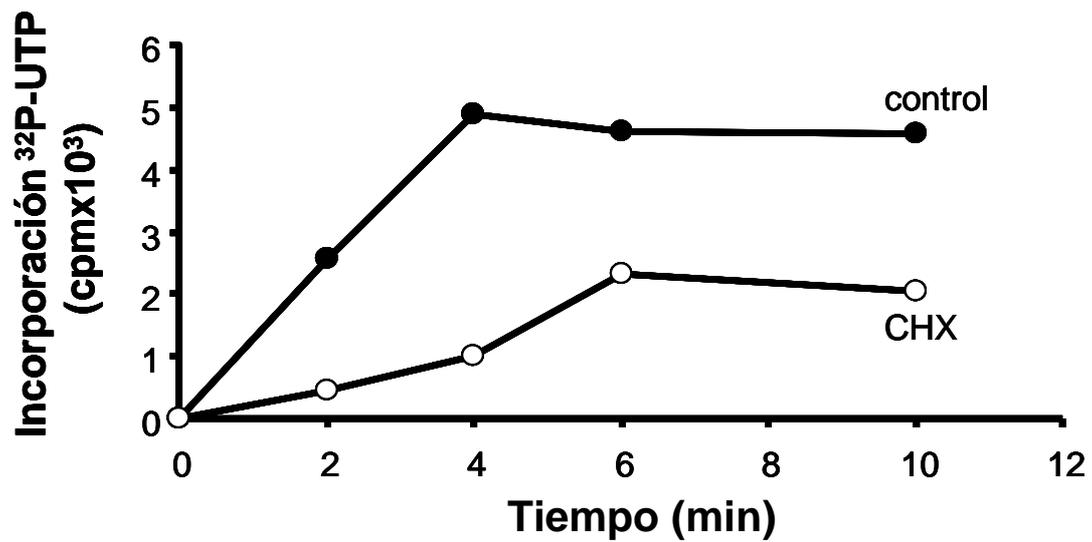


Figura 17. Reducción de la actividad transcripcional de epimastigotes tratados con CHX. La incorporación de UTP radiactivo en el RNA naciente fue significativamente mayor en preparaciones de núcleos aislados de parásitos creciendo en medio LIT (● control) que en células con CHX (○). Se gráfica el promedio de dos experimentos independientes.

A nivel de la ultraestructura del nucléolo, la CHX causó una reducción significativa de su tamaño en ambos días de tratamiento, estimación que se realizó con el programa computacional ImageJ (Fig. 18).

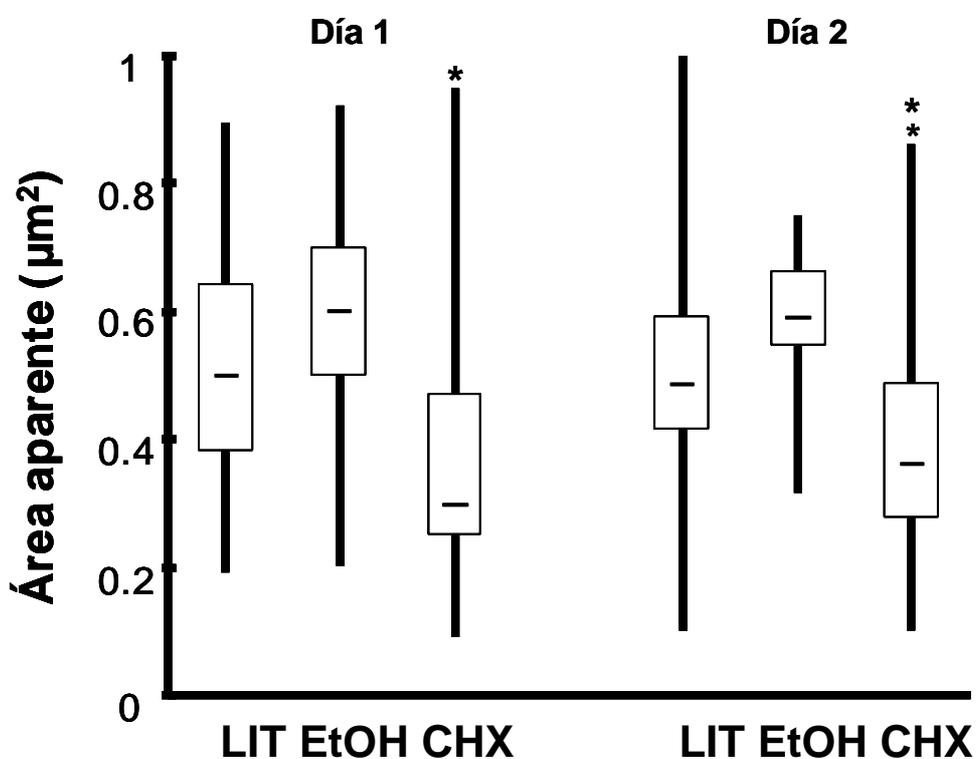


Figura 18. Efecto de la CHX sobre el tamaño del nucléolo. Este antibiótico produjo una reducción significativa del área nucleolar de los epimastigotes. En la gráfica están resumidos los datos obtenidos. Las cajas agrupan los valores del 25 al 75% de las observaciones, las líneas horizontales representan la mediana, y la barra vertical corresponde al rango de cada grupo. El número promedio de fotografías de cada grupo fue de 20. (\*) y (\*\*) marcan diferencias significativas entre células tratadas con CHX vs control, comparaciones de 1 y 2 días respectivamente. En ambos casos  $P < 0.05$ . No existió diferencia entre el grupo control vs células con en vehículo.

En todas las condiciones examinadas se observó un nucléolo con una arquitectura similar: el componente granular es el principal constituyente y también está presente el componente fibrilar denso. Aparentemente la CHX no altera la organización nucleolar. Es importante mencionar que después de tres días de tratamiento con CHX, la mayoría de las células están fragmentadas por

lo que un análisis es imposible (dato no mostrado). Es evidente que la presencia del etanol en el medio de cultivo es inocua a la concentración añadida al medio (Fig. 18 y 19).

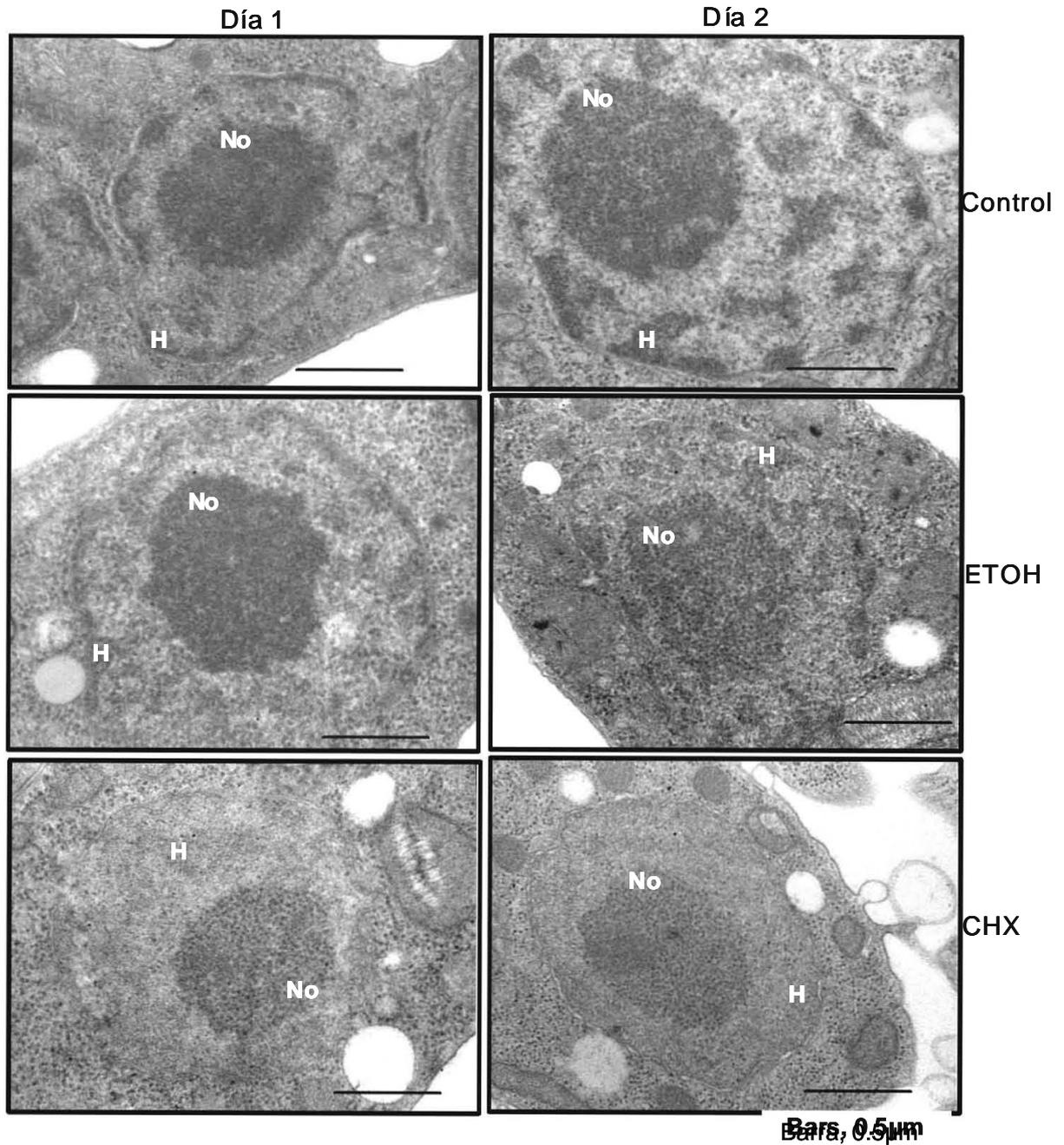


Figura 19. Efecto de la CHX sobre el nucléolo de epimastigotes en cultivo. Fotografías de microscopía electrónica en las que se aprecia la reducción del tamaño de la estructura nucleolar inducida por este antibiótico. Es interesante la conservación del nucléolo en células tratadas con CHX aún después de dos días de tratamiento. La barra indica 0.5µm.

- **Ensayos de retardo**

En este trabajo describimos una marcada reducción de la síntesis de RNA (evaluada por la incorporación de UTP radiactivo) en epimastigotes de la fase estacionaria del cultivo (Fig. 12). Al igual que en otros eucariontes, en *T. cruzi* el RNAr representa con mucho la mayor proporción del RNA total de la célula (Elias et al., 2001), por lo anterior es posible sugerir que la actividad de la Pol I es, principalmente, la más afectada. En un intento por encontrar una explicación a la disminución de la transcripción en la fase estacionaria, se decidió investigar sobre una probable reducción en la formación de complejos proteicos relacionados con la Pol I sobre el promotor distal del DNAr de epimastigotes de *T. cruzi*. Para esto se realizaron interacciones utilizando extractos nucleares (obtenidos de parásitos de la fase exponencial o estacionaria) y un fragmento de 64 pares de bases que abarca de la posición -48 a +14 e incluye el TSP del DNAr (Fig. 20).

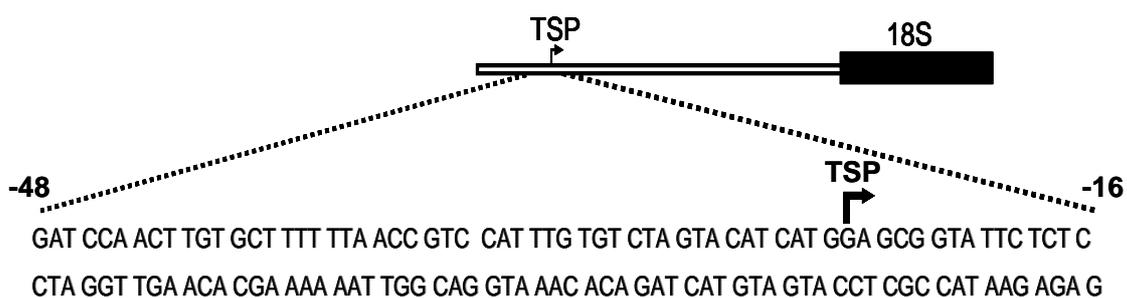


Figura 20. Secuencia del fragmento del promotor distal del DNAr de *T. cruzi* de 64 pares de bases de largo que comprende de la posición -48 a +16 con respecto al TSP (indicado con la flecha). Este DNA fue marcado radiactivamente en el extremo 5' para realizar los ensayos de retardo en gel. El inicio del gen 18S es ilustrado, seguida se encuentra la región que codifica para el RNAr 5.8S y el fragmentado 28S que no están mostrados.

Se encontró una banda de retardo similar tanto en distancia de migración y en intensidad (Exp 59630 vs Sta 61333 unidades densitométricas obtenidas con el programa ImageJ) con los dos extractos nucleares probados (Fig. 21). Estos hallazgos sugieren el reclutamiento de proteínas y el ensamblaje de complejos proteicos sobre el promotor del DNAr en las dos condiciones experimentales, sin embargo, la identidad y la funcionalidad de estos arreglos es desconocido. Cabe mencionar que la especificidad de la banda de interacción fue rectificada al realizar ensayos de competencia específica (agregando al tubo de reacción el fragmento del DNAr no radiactivo) e inespecífica (añadiendo un DNA no relacionado).

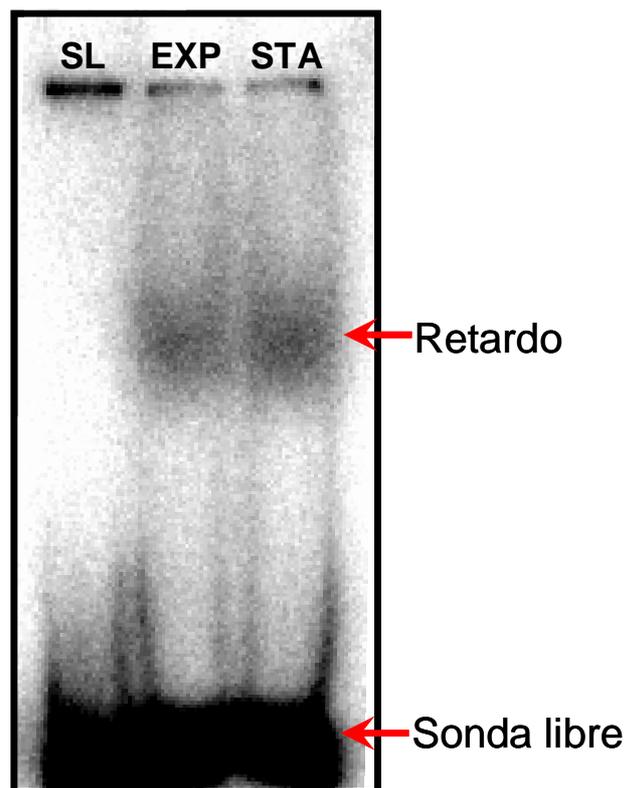


Figura 21. Interacción entre un fragmento del promotor del DNAr con proteínas nucleares de *T. cruzi*. En ambas condiciones experimentales (exponencial o estacionaria) se observó una banda de retardo que presenta una distancia de migración electroforética y una intensidad similar, la cual, está ausente en la línea que corresponde a la sonda libre (SL; carril 1). En el carril 2 se depositaron la sonda radiactiva más 6µg de extracto proteico nuclear de parásitos de fase exponencial. En el carril 3 están 6µg de extracto proteico nuclear de parásitos de fase estacionaria.

- **Participación del nucléolo en la metaciclologénesis temprana**

La metaciclologénesis es la transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos (ver ciclo de vida; Fig. 2), la cual ocurre en el tracto digestivo del insecto transmisor y en cultivos axénicos (Camargo, 1964). En la transición entre estos dos formas, se ha observado la existencia de células morfológicamente diferentes que se caracterizan por presentar el cinetoplasto en posición perpendicular con respecto al núcleo; este tipo de parásitos son llamados intermedios. Durante la determinación del tamaño y la arquitectura del nucléolo que aquí reportamos, visualizamos algunas células intermedias que presentaban una estructura nucleolar con las características mencionadas (Fig. 22).

En otros eucariontes es generalmente aceptado que el nucléolo participa en eventos adicionales a la biogénesis ribosomal, por lo tanto y apoyado en nuestras observaciones, se planteó la hipótesis de que el nucléolo de los epimastigotes podría estar involucrado en la diferenciación celular. Para analizar esta situación, se obtuvieron parásitos de distintos días de la curva de crecimiento y la búsqueda de células intermedias se realizó por microscopía electrónica. De un elevado número de cortes de los días 6, 7 y 8 del cultivo solamente pudimos encontrar 18 núcleos de parásitos intermedios, de los cuales 13 poseen un nucléolo (Fig. 22).

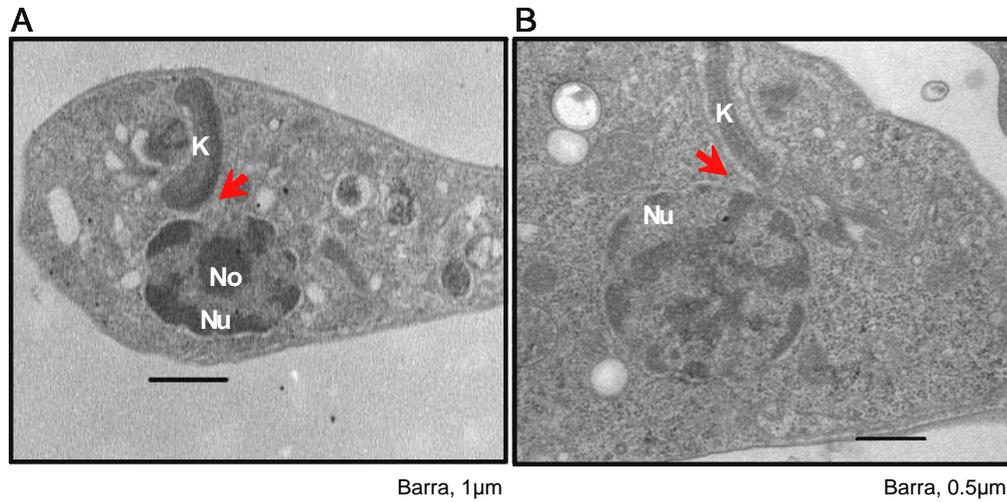


Figura 22. El nucléolo en la diferenciación celular de epimastigotes. Fotografías de microscopía electrónica en las que se observan parásitos intermedios que tienen la característica morfológica de poseer el cinetoplasto en una posición perpendicular al núcleo. A) Célula intermedia con nucléolo. La barra indica 1  $\mu\text{m}$  B) Parásito sin nucléolo. El tamaño de la barra representa 0.5  $\mu\text{m}$ . K, cinetoplasto; No, nucléolo; Nu, núcleo.

Considerando que el número de imágenes era escaso, fue inducida la diferenciación *in vitro* de epimastigotes en medio M-16 con el objetivo de enriquecer la cantidad de formas intermedias y así facilitar su observación bajo el microscopio electrónico de transmisión (Fig. 23).

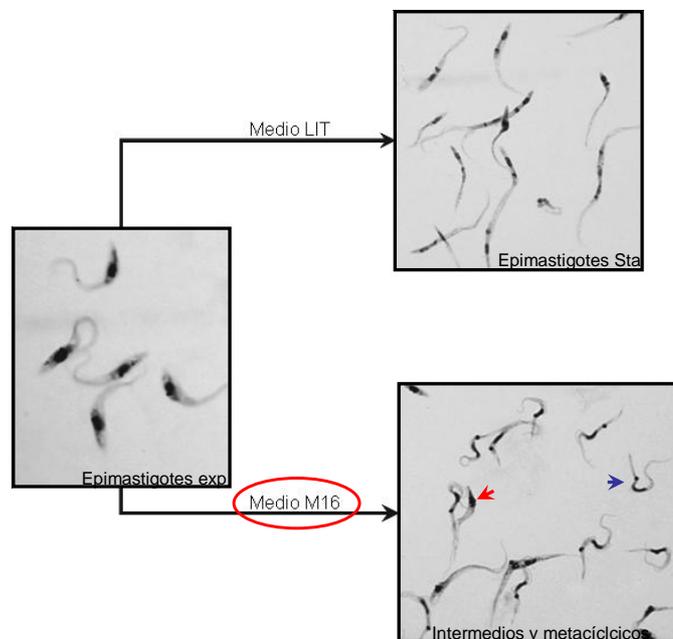


Figura 23. Diferenciación de epimastigotes *in vitro* en medio M-16. Fotografías de microscopía óptica de parásitos teñidos con el kit HEMA3. En la fase exponencial los epimastigotes son parásitos ovales (A) esta morfología cambia durante la fase estacionaria en la cual las células son alargadas y delgadas (B). Después de mantenerse cuatro días en medio M-16 (que es pobre en nutrientes) el cultivo está enriquecido con parásitos intermedios (flecha negra) y con tripomastigotes metacíclicos (flecha roja).

Se obtuvieron 17 fotografías electrónicas de parásitos intermedios, en 11 de estas las células no se puede visualizar el nucléolo, solamente en seis fue posible su identificación (Fig. 24).

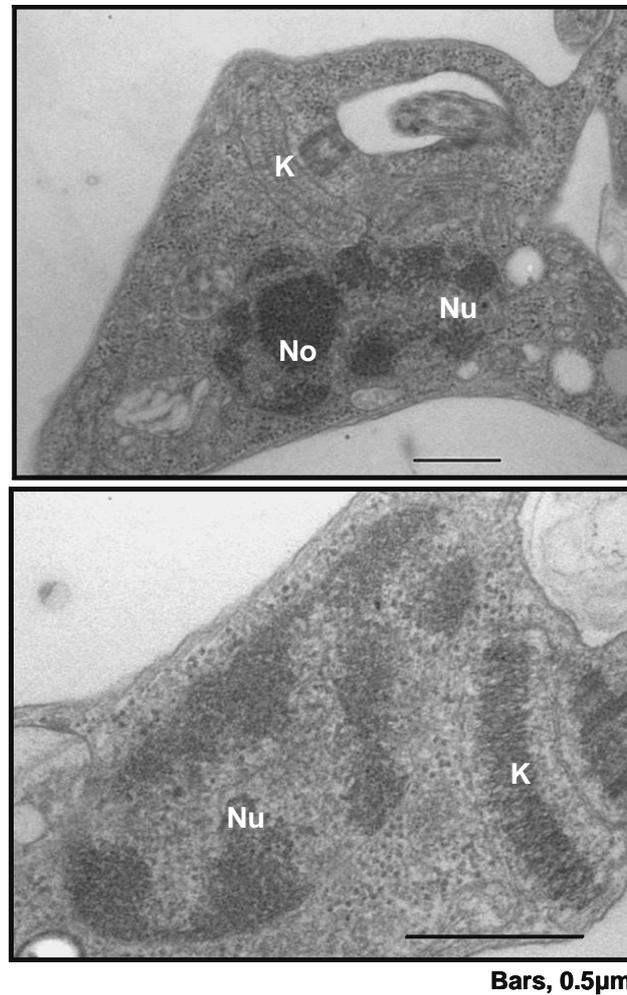


Figura 24. Células intermedias de *T. cruzi* obtenidas en medio M-16. Fotografías de microscopía electrónica del núcleo de parásitos en proceso de diferenciación. A) Célula con nucléolo. B) Parásito sin nucléolo. K, cinetoplasto; No, nucléolo, Nu, núcleo.

En conclusión, después de analizar un número elevado de cortes, mencionamos que la cantidad total de imágenes de parásitos intermedios fue de 35. En 19 de estas, está presente una estructura nucleolar bien organizada. En las 16 restantes no es evidente su presencia. En estas condiciones no podemos determinar si nucléolo participa esencialmente en el tránsito temprano de la forma epimastigote al estadio tripomastigote metacíclico.

## 6. DISCUSIÓN

La biogénesis ribosomal es un proceso regulado que se realiza, casi en su totalidad, en el nucléolo de los eucariontes. La síntesis de las subunidades que forman un ribosoma requiere de cantidades elevadas de energía y se ha observado que está ligada a la disponibilidad de nutrientes y a la proliferación celular. El conjunto de eventos involucrados en la generación de las partículas ribosomales, las vías de señalización relacionadas, así como el ensamblaje, la organización y la multifuncionalidad de la estructura nucleolar han sido extensivamente estudiados en mamíferos, plantas y levaduras; sin embargo, en organismos unicelulares como *T. cruzi* la información es menos abundante.

El nucléolo de epimastigotes de *T. cruzi* aparece al microscopio electrónico como una estructura intranuclear circular, que está formada por un componente fibrilar denso y por un componente granular (López-Velázquez et al., 2005). Este organelo es ensamblado solamente en los estadios proliferativos del parásito (amastigotes y epimastigotes; Elias et al., 2001; López-Velázquez et al., 2005), aquellos que requieren una generación elevada de RNA y de proteínas. Para establecer el vínculo entre replicación celular, actividad metabólica y génesis ribosomal en *T. cruzi*, es importante caracterizar parámetros básicos como lo son: la tasa de transcripción y el tamaño del nucléolo. La curva de crecimiento de epimastigotes representa un sistema apropiado para analizar posibles cambios moleculares y celulares en este organismo bajo diferentes condiciones de proliferación.

En este trabajo, determinamos la tasa de transcripción en núcleos extraídos de parásitos en cultivo bajo condiciones de crecimiento positivo (Exp) y negativo (Sta). Encontramos una marcada reducción en la cantidad de  $^{32}\text{P}$ -UTP que se incorpora en el transcrito naciente en células de la fase estacionaria (Nepomuceno-Mejía et al., 2010). Este hallazgo correlaciona con datos previos de nuestro laboratorio (también obtenidos por ensayos de “run on”) que muestran que en parásitos completos permeabilizados con lisolecitina, la generación *de novo* de RNA es seis veces mayor durante el periodo de crecimiento exponencial en comparación con lo observado en organismos que no se duplican.

Una de las características principales de la fase estacionaria es la falta de replicación celular, hecho que puede hacer obvias nuestras observaciones. Sin embargo, una determinación cuantitativa de la síntesis de RNA en epimastigotes era necesaria. La información recuperable en la literatura es incompleta y contradictoria; por un lado, se describió una disminución significativa de la actividad transcripcional en epimastigotes durante la fase estacionaria, pero el dato no fue mostrado (Elias et al., 2001). De manera contradictoria, una segunda y más reciente publicación revela que las formas no infectivas presentes en el periodo estacionario tienen una transcripción elevada originada por la acción de la Pol II, aunque la participación de la Pol I no fue analizada (Ferreira et al., 2008).

Tomando en consideración que durante la fase estacionaria del cultivo la transcripción total disminuye y que la actividad enzimática de la RNA

polimerasa I, es con mucho la mayoritaria en *T. cruzi* (Elias et al., 2001), es posible concluir que en este organismo la síntesis de RNAr se regula negativamente durante el periodo donde no hay proliferación. La relación que existe entre la replicación celular y la transcripción del DNAr está presente en un amplio rango de especies, desde eucariontes unicelulares de divergencia temprana hasta células de vertebrados, sugiriendo su conservación a lo largo de la evolución (Moss et al., 2007). En este sentido, la literatura actual propone que los factores de crecimiento y los agentes químicos que estimulan la división de las células incrementan significativamente la transcripción de los genes ribosomales, mientras que las condiciones que dañan el metabolismo, como pueden ser: la falta de nutrientes, la inhibición de la traducción y la confluencia celular disminuyen la síntesis de RNAr (Revisado por Drygin et al., 2010). Es importante recalcar que todos estos fenómenos han sido observados durante la fase estacionaria de células en cultivo.

En eucariontes, el nucléolo se organiza al suceder la transcripción del DNAr (Hadjiolov, 1985; Mèlèse & Xue, 1995). *T. cruzi* posee alrededor de 100 copias del cistrón ribosomal (Castro et al., 1981) y una estructura nucleolar bipartita (López-Velázquez et al., 2005). En el presente trabajo analizamos la ultraestructura del nucléolo de epimastigotes durante diferentes condiciones de proliferación. Observamos que en células de fase exponencial este subdominio nuclear es el de mayor tamaño, es electrodensito y posee una arquitectura primordialmente granular. Es también claro que el citoplasma de parásitos creciendo activamente presenta una cantidad abundante de

ribosomas. La interpretación más simple es que la biomasa de células en duplicación necesita de una vigorosa actividad de síntesis de proteínas.

Es interesante que el tamaño del nucléolo disminuya conforme el tiempo de cultivo avanza y los nutrientes son consumidos. El máximo grado de reducción se alcanza cuando los parásitos entran a la fase estacionaria, eventos que correlacionan con una tasa de transcripción baja. En *T. cruzi* se ha descrito el desensamblaje de la estructura nucleolar bajo situaciones de arresto transcripcional como lo son la mitosis (de Souza, 2002) y la diferenciación celular hacia estadios no proliferativos (Elias et al., 2001).

Como un acercamiento a la descripción de la maquinaria transcripcional de los genes ribosomales y buscando evidencia de alguna diferencia potencial en núcleos de parásitos de la fase exponencial o de la estacionaria que explique la reducción de síntesis de RNA, se realizaron ensayos de retardo electroforéticos usando como sonda un fragmento del promotor del DNAr que contiene el TSP. No fuimos capaces de evidenciar desigualdades entre los extractos proteicos obtenidos de epimastigotes en las dos condiciones de cultivo (exponencial y estacionaria), puesto que se encontró un perfil similar, sin embargo, es importante mencionar que existe la probabilidad de que la composición proteica de ambos complejos sea diferente. A pesar de ser una técnica con una alta sensibilidad, los ensayos de retardo en gel (EMSA) no sirven para determinar la identidad ni la funcionalidad de los complejos formados. Para conocer la naturaleza de las proteínas que se reclutan al promotor del DNAr se requiere utilizar una metodología complementaria al EMSA, el MALDI-TOF sistema que

permite la identificación de proteínas, entre otras biomoléculas. Por otra parte, para conocer la funcionalidad de los extractos nucleares de ambas condiciones una herramienta metodológica adecuada serían los ensayos de transcripción *in vitro*.

En eucariontes se ha aceptado la existencia de dos mecanismos que regulan la síntesis del RNAr. El primero incluye un cambio en la tasa de transcripción de cada unidad de transcripción ribosomal. Este evento se realiza por la modificación postraduccional reversible de las subunidades de la Pol I y/o de sus factores proteicos auxiliares. Estas alteraciones pueden afectar el ciclo de transcripción del DNAr que incluye: el ensamblaje del complejo de Pol I, el inicio, la slida del promotor, la elongación del transcrito y la terminación de la síntesis de RNAr. Se ha descrito que la actividad de los factores de transcripción específicos de la Pol I (UBF, SL1, TIF 1A) es regulada por fosforilación catalizadas por las cinasas: proteína cinasa 2 (CK2), cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), cinasa blanco de rapamicina (TOR) y por la cinasa dependiente de ciclinas (CDK). Otra modificación involucrada es la acetilación, que se realizada por la proteína de unión a CREB (CBP) y por el factor asociado a P300/CBP (PCAF; Grummt, 2003; Mayer & Grummt, 2006; Moss et al., 2007; Drygin et al., 2010). Es interesante que algunos de los genes que codifican para estas proteínas de modificación (no así los de los factores de transcripción que requiere Pol I) están anotados en el genoma de *T. cruzi* ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), lo que podría sugerir su participación en regular la transcripción del DNAr en respuesta a las condiciones fisiológicas de un determinado momento.

El segundo mecanismo de regulación involucra el silenciamiento de genes ribosomales transcripcionalmente activos principalmente por reacciones de metilación de nucleótidos y la desacetilación de las histonas que los mantienen en una conformación de tipo heterocromatina (Mc Stay & Grummt, 2008; Drygin et al., 2010; Boulon et al., 2010). En la mayoría de los organismos, se ha determinado que solamente el 50% (o menos) del número total de cistrones ribosomales es competente para ser transcrito aún en condiciones de proliferación activa. Cabe destacar que este porcentaje se reduce significativamente en células que entran en la fase estacionaria del cultivo (Dammann et al., 1994). En las fotografías de microscopía electrónica, que aquí analizamos, se pueden distinguir cúmulos pequeños de heterocromatina localizados en la periferia del núcleo en epimastigotes que se duplican activamente. En los parásitos de la fase estacionaria la heterocromatina ocupa una porción significativa del volumen nuclear. Por lo anterior es posible suponer que la reducción de la síntesis de RNA que encontramos pueda ser consecuencia de la inactivación transcripcional del DNAr por un mecanismo de heterocromatinización.

Por último, el tratamiento de las células con cicloheximida (CHX) produjo el cese de la duplicación celular y de la transcripción. A nivel nucleolar causó una reducción significativa en el tamaño sin la alteración aparente de la arquitectura del nucléolo en donde el componente granular es el principal elemento estructural. El efecto de este fármaco en otros eucariontes depende del tipo celular e incluye: el desensamblaje total del nucléolo después de cuatro horas de administración (Ghosh & Pawelets, 1994) o bien una disminución significativa de su volumen que está acompañada con cambios importantes en

su ultraestructura (Lafarga et al., 1994). No sabemos por qué la estructura nucleolar de *T. cruzi* es relativamente resistente a CHX. La disminución en el tamaño del nucléolo observado en células tratadas podría ser explicada por el arresto celular en proliferación.

Los hallazgos de este trabajo fueron la demostración de que la actividad transcripcional en los epimastigotes en cultivo es significativamente menor durante la fase estacionaria, evento que correlaciona con una reducción del número de parásitos que tienen nucléolo y con la disminución del tamaño de este organelo. Adicionalmente se observó que la arquitectura nucleolar es distinta, en parásitos de fase exponencial el componente granular es el elemento principal del nucléolo y está claramente separado del componente fibrilar denso, mientras que en células de la fase estacionaria existe una marcada reducción de la proporción del componente granular y parece estar intermezclado con la porción fibrilar densa. Interesantemente la reinoculación de parásitos envejecidos, que no se duplican, que tienen una gran cantidad de heterocromatina en el núcleo y que tienen un nucléolo pequeño, en un medio rico en nutrientes produce una reactivación de la proliferación y una reorganización nuclear importante que incluye el incremento en el tamaño del nucléolo y una reorganización de sus componentes así como también un rearrreglo de la cromatina. Por todo lo anterior, es evidente que en *T. cruzi* existe una relación estrecha entre la disponibilidad de nutrientes, la proliferación celular, la síntesis de RNAr, el tamaño y la organización del nucléolo, como ocurre en otros tipos celulares.

## 7. CONCLUSIONES

- En *T. cruzi* durante la fase de transcripción activa existe una elevada actividad transcripcional que correlaciona con un nucléolo grande y electrodenso.
- La arquitectura de esta estructura es primordialmente granular. La presencia del componente fibrilar denso también es evidente. Este tipo de organización puede ser producto de una biogénesis ribosomal elevada.
- Durante la fase estacionaria se encontró una menor síntesis de RNA y una reducción del tamaño del nucléolo. La disposición espacial de los componentes nucleolares es poco clara, aparentemente están intermezclados.
- La inhibición de la traducción impide la división celular, reduce la transcripción y disminuye el tamaño del nucléolo, sin afectar su estructura.
- Existe una formación de un complejo proteico sobre la región con actividad promotora del DNAr. No se encontraron diferencias entre extractos de fase exponencial o de estacionaria en cuanto a la distancia de migración y a la intensidad de la banda de retardo. Sin embargo, ni la identidad ni la funcionalidad de estos complejos fue determinada.
- Es evidente la relación que existe entre la síntesis de RNAr, la proliferación celular y el tamaño del nucléolo. Esta situación ha sido descrita en otros eucariontes, lo que indica su conservación a lo largo de la evolución.

## 8. PERSPECTIVAS

- Aislar el nucléolo de *T. cruzi* y determinar su composición proteica.
- Establecer el número de copias del DNAr que son transcripcionalmente activas.
- Demostrar que la actividad transcripcional de la Pol I es la principal afectada en la fase estacionaria.
- Identificar la identidad de las proteínas que se ensamblan sobre el promotor del DNAr en la fase exponencial y en la estacionaria y la demostración de su funcionalidad.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AK, Lam YW, Steen H, Mann M, Lamond AI (2002): Direct proteomic analysis of the human nucleolus. *Current Biology* 12: 1-11.
- Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M (2005): Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433: 77-83.
- Astolfi Filho S, De Sá MF, Gander ES (1984): Protein synthesis in purified trypano- and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 41:109-115.
- Benz C, Nilsson D, Anderson B, Clayton C, Guilbride DL (2005): Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Biochemical Parasitology* 143: 125-134.
- Blum B, Bakalara N, Simpson L (1990): A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 60:189-198.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI (2007): The multifunctional nucleolus. *Nature Review Molecular Cell Biology* 8:574-85.
- Boulon S, Westman B, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI (2010): The nucleolus under stress. *Molecular Cell* 40: 216-227.
- Campbell D, Thomas S, Sturm N (2003): Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes and Infection* 5:1231-1240.
- Castro C, Hernández R, Castañeda M (1981): *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecule mass species and number of genes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2: 219-233.
- Camargo EP (1964): Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*, origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Rev Inst Med Trop sao Paulo* 12: 93-100.
- Clayton C (2002): Developmental regulation without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21: 1881-1888.
- Clayton C, Shapira M (2007): Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular Biochemical Parasitology* 156: 93-101.
- Cmarko D, Verschure PJ, Rothblum LI, Hernandez-Verdun D, Amalric F, van Driel R, Fakan S (2000): Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem Cell Biology* 113: 181-187.
- de Souza W (2002): Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design* 8: 269-285.
- de Souza W (2007): Chagas disease: facts and reality. *Microbes and infection* 9: 544-545.
- Dietrich P, Soares MB, Affonso MTH, Floeter-Winter LM (1993): The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene; analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene* 125: 103-107.
- Drygin D, Rice W, Grummt I (2010): The RNA polymerase I transcription machinery: An emerging target for the treatment of cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50: 131-156.
- Elias MC, Marques-Porto R, Freymüller E, Schenkman S (2001): Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 112: 79-90.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G et al., (2005): Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309: 404-409.
- Ersfeld K, Melvilla SE, Gull K (1999): Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today* 15: 58-63.
- Ferreira LR, Dossin F de M, Ramos TC, Freymüller E, Schenkman S (2008): Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 80: 157-166.

- Figueroa-Angulo E, Martínez-Calvillo S, López-Villaseñor I, Hernández R (2003): Evidence supporting a major promoter in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters* 225: 221-225.
- Figueroa-Angulo E, Cevallos AM, Zentella A, López-Villaseñor I, Hernández R (2006): Potential regulatory elements in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter. *Biochimica et Biophysica Acta* 1759: 497-501.
- Gao H, Ayub M, Levin M, Frank J (2005): The structure of the 80S ribosome from *Trypanosoma cruzi* reveals unique rRNA components. *PNAS* 101: 10206-10211.
- Ghosh S, Paweletz N (1994): Nucleolar organization as revealed in cycloheximide treated cells. *Cell Biology International* 18: 783-789.
- Grummt I (2003): life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes and Development* 17: 1691-1702.
- Hadjilov AA (1985): The nucleolus and ribosome biogenesis. Wien: Springer Verlag.
- Haile S, Papadopoulou B (2007): Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology* 10: 569-577.
- Heix J, Grummt I (1995): Species specificity of transcription by RNA polymerase I. *Current Opinion in Genetics and Development* 5: 625-656.
- Helh A, Roditi I (1994): The regulation of procyclin expression in *Trypanosoma brucei*: making or breaking the rules?. *Parasitol Today* 10: 442-445.
- Hernández R, Castañeda M (1983): An endonuclease restriction analysis of the ribosomal RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 8: 305-315.
- Hernández R, Diaz de León F, Castañeda M (1988): Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 27: 275-280.
- Hernández R, Nava G, Castañeda M (1983): Small size ribosomal RNA species in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 8: 297-304.
- Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine LJ (2010): The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. DOI:10.1002/wrna.39
- Hernandez-Verdun D (2006): The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biology* 126: 135-148.
- Huang J, Van der Ploeg LHT (1991): Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: Discriminating the PARP promoter from immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO Journal* 10:3877-3885.
- Huang S (2002): Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *The Journal of Cell Biology* 157:739-741.
- Imbert JL, Figueroa AH, Gómez JV (2003): Tripanosomiasis americana o "mal de Chagas" Otra enfermedad de la pobreza. *Elementos* 49:13-21.
- Jäger A, De Gaudenzi J, Cassola A, D'Orso I, Frasch A (2007): mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *PNAS USA*104:2035-2042.
- Koberna K, Malínský J, Pliss A, Masata M, Vecerova J, Fialová M, Bednár J, Raska I (2002): Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of "Christmas trees" in situ. *Journal Cell Biology* 157:743-748.
- Lafarga M, Berciano MT, Andres MA, Testillano PS (1994): Effects of cycloheximide on the structural organization of the nucleolus and the coiled body in normal and stimulated supraoptic neurons of the rat. *Journal of Neurocytology* 23: 500-513.
- LeBowitz JH, Smith H, Rusche L, Beverly S (1993): Coupling of poly(A) site selection and *trans*-splicing in *Leishmania*. *Genes & Development* 7: 996-1007.

- López-Velázquez G, Hernández R, López-Villaseñor I, Reyes-Vivas H, Segura-Valdez ML, Jiménez-García LF (2005): Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy & Microanalysis* 11: 293-299.
- Lorca M (2001): La enfermedad de Chagas congénita, transfusional y otras vías en el contexto de la interrupción de la transmisión vectorial. Grupo de trabajo OPS en Enfermedad de Chagas. Montevideo, Uruguay.
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu E, Tschudi C (2000): A new twist in trypanosome metabolism: cis splicing of pre-mRNA. *RNA* 6: 163-169.
- Martínez-Calvillo S, Hernández R (1994): *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142: 243-247.
- Martínez-Calvillo S, Lopez I, Hernández R (1997): pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene* 199: 71-76.
- Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ (2003): Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular Cell* 11: 1291-1299.
- Martínez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ (2004): Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryotic Cell* 3: 506-517.
- Matthews K, Tschudi C, Ullu E (1994): A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes & Development* 8: 491-501.
- Mayer C, Grummt I (2006): Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 25: 6384-6391.
- McStay B, Grummt I (2008): The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24: 131-157.
- Mélèse T, Xue Z (1995): The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 314-324.
- Moss T, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Stefanovsky V (2007): A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 64: 29-49.
- Mount SM (1982): A catalog of splice junction sequences. *Nucleic Acids Research* 10:459-472.
- Navarro M, Peñate X, Landeira D (2007): Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends in Microbiology* 15: 263-270.
- Ogbadoyi E, Ersfeld K, Robinson D, Sherwin T, Gull K (2000): Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Cromosoma* 108: 501-513.
- OMS (2008): Enfermedad de Chagas: 100 años después.
- OMS (2009): Enfermedad de Chagas: control y eliminación.
- Parson M, Ledbetter JA, Schieven GL, Nel AE, Kanner SB (1994): Developmental regulation of pp44/46, tyrosine-phosphorylated proteins associated with tyrosine/serine kinase activity in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Biochemical Parasitology* 63: 69-78.
- Pederson T (1998): The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Research* 26: 3871-3876.
- Pederson T (2010): The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Mar 1;3(3). pii: a000638. doi: 10.1101/cshperspect.a000638.
- Perry K, Watkins K, Agabian N (1987): Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a splice leader. *PNAS USA* 84:8190-8194.
- Polido M, Martínez-calvillo S, Hernández R (1996): *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeat element from the non-transcribed spacer is locus specific. *Acta Tropica* 62: 163-170.

- Radwanska M, Couvreur B, Dumont N, Pays A, Vanhamme L, Pays E (2000): A transcript encoding a proteasome beta-subunit and a zinc finger protein in *Trypanosoma brucei brucei*. *Gene* 255: 43-50.
- Raska I, Koberna K, Malínský J, Fidlerová H, Masata M (2004): The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell* 96: 579-594.
- Raska I, Shaw P, Cmarko D (2006): Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 325-334.
- Reeder RH (1992): Regulation of transcription by RNA polymerase I. In *Transcriptional regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Reifur L, Yu L, Cruz-Reyes J, vanHartesvelt M, Koslowsky D (2010): The impact of mRNA structure on guide RNA targeting in kinetoplastid RNA editing. *Plos ONE* 5: e12235. doi:10.1371/journal.pone.0012235
- Russell J, Zomerdijk JC (2006): The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochemical Society symposium* 73: 203-216.
- Scheer U, Weisenberger D (1994): The nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology* 6: 354-359.
- Scheer U, Hock R (1999): Structure and function of the nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 385-390.
- Schettino P, Arteaga I, Cabrera M (2005): Tres especies de triatominos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina* 65: 63-69.
- Simpson L, Sbicego S, Aphasizhev R (2003): Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: A complex business. *RNA* 9: 265-276.
- Simpson L, Aphasizhev R, Gao G, Kang X (2004): Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. *RNA* 10: 159-170.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D (2008): Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biology* 129:13-31.
- Sollner-Webb B, Mougey E (1991): News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trend in Biochemical Science* 16: 58-62.
- Stuart K, Allen T, Kable M, Lawson S (1997): Kinetoplastid RNA editing: complexes and catalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 1: 340-346.
- Stuart K, Schnauffer A, Lewis-Ernst N, Panigrahi A (2005): Complex management: RNA editing in trypanosomes. *TRENDS in Biochemical Sciences* 30: 97-105.
- Teixeira SMR (1998): Control of gene expression in trypanosomatidae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31: 1503-1516.
- Thiry M, Lafontaine LJ (2005): Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends in cell Biology* 15:194-199.
- Tittawella I, Yasmin L, Baranov V (2003): Mitochondrial ribosomes in trypanosome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307: 578-583.
- Tyler-Cross RE, Short SL, Floeter-Winter LM, Buck GA (1995): Transient expression mediated by *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology* 72: 23-31.
- Tyler KM, Engman DM (2001): The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology* 31: 472-481.
- Ullu E, Tschudi C (1995): Accurate modification of the Trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 20365-20369.
- Vanhamme L, Pays E (1995): Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiological Reviews* 59: 223-240.
- Wagner W, So M (1990): Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect Immunology* 58: 3217-3224.

Warner JR (1990): The nucleolus and ribosome formation. *Current Opinion in Cell Biology* 2: 521-527.

Yu FL, Feigelson P (1972): The rapid turnover of RNA polymerase of rat liver nucleolus, and of its messenger RNA. *PNAS* 69: 2833-2837.



## RESEARCH LETTER

## The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases

Tomás Nepomuceno-Mejía<sup>1</sup>, Reyna Lara-Martínez<sup>2</sup>, Ana María Cevallos<sup>1</sup>, Imelda López-Villaseñor<sup>1</sup>, Luis Felipe Jiménez-García<sup>2</sup> & Roberto Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., México; and <sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F., México

**Correspondence:** Roberto Hernández, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria 04510, México, D.F., México. Tel. +52 55 5622 8953; fax. +52 55 5622 9212; e-mail: roberoh1@biomediticas.unam.mx

Received 13 January 2010; revised 4 September 2010; accepted 9 September 2010.  
Final version published online 29 September 2010.

DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02117.x

Editor: Claire Ramade

**Keywords:** kinetoplastic; rRNA; cell growth; development.

### Introduction

The American trypanosome *Trypanosoma cruzi* is a parasite that infects humans as well as sylvatic and domestic animals. Human infection may result in Chagas disease, which is widespread in Mexico, Central and South America. As is the case with other protozoa, *T. cruzi* possesses a complex life cycle in both vertebrate and insect vectors. If present in the peripheral blood of a mammalian host, *T. cruzi* trypomastigotes may be ingested during a blood meal by the haematophagous reduviid bug. In the hindgut of this vector, the parasites first develop into replicative amastigotes and then into flagellated epimastigotes. Next, elongated forms of epimastigotes attach to the distal portion of the vector's hindgut before differentiation into nondividing metacyclic trypomastigotes. These forms are excreted *in situ*, along with urine and faeces, after the blood meal. Contamination of the insect-bite wound or mucous membranes of the mammalian host with these excreta leads to infection. Within the

### Abstract

Our group is interested in rRNA and ribosome biogenesis in the parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi*. Epimastigotes represent an extracellular replicative stage of *T. cruzi* and can be cultured in axenic media. The growth curve of epimastigotes allows assessment of potential differences in the nucleoli of cells undergoing growth-rate transitions. To establish cellular parameters for studying ribosome biogenesis in *T. cruzi*, a morphometric analysis of the nucleoli of cultured cells in the exponential and stationary phases was conducted. Electron micrograph-based measurements of nuclear sections from independent cells demonstrated that the nucleolar area is over twofold higher in exponentially growing cells, as compared with epimastigotes in the stationary phase. The granular component of the nucleoli of actively growing cells was the main structural element. Cycloheximide moderately reduced the apparent size of the nucleoli without an apparent disruption of their architecture. Our results provide a firm basis for the establishment of an experimental model to study the organization of the nucleolus during the growth and development of *T. cruzi*.

vertebrate host, *T. cruzi* is able to infect a wide range of nucleated cells, in which proliferation into intracellular amastigotes and intermediate flagellated forms occurs. New nondividing trypomastigotes then emerge into the bloodstream due to host-cell lysis. This *T. cruzi* residence in the host is maintained by the successive infection of cells by blood trypomastigotes (Tyler & Engman, 2001).

Differential gene expression occurs during the development of *T. cruzi*, mainly via post-transcriptional regulation of mRNAs (Teixeira, 1998; Haile & Papadopoulos, 2007). Our laboratory is interested in the organization and expression of the atypical modular rRNA gene system of this microbial eukaryote (Hernández *et al.*, 1993; Figueroa-Angulo *et al.*, 2006), as well as in the architecture of its nucleolus (López-Velázquez *et al.*, 2005). *Trypanosoma cruzi* can organize well-defined nucleoli that are disassembled during nondividing developmental stages of its life cycle (Elias *et al.*, 2001). Since the early work of Camargo (1964), it has been widely accepted that the growth curve of dividing

epimastigotes can give rise to nondividing metacyclic trypomastigotes in the stationary phase. To provide cellular parameters for basic research on *T. cruzi*, we studied differences in nucleolar size when exponentially growing epimastigotes stop dividing as they enter the stationary phase. Nucleoli from cells in which protein synthesis was disrupted were analysed as well. The work presented here offers a firm basis for the establishment of an experimental system to analyse the organization of the nucleolus during growth-rate transitions in *T. cruzi*.

## Materials and methods

### Cell cultures

*Trypanosoma cruzi* epimastigotes from the CL Brener strain were grown at 28 °C in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Camargo, 1964). These cultures become heterogeneous over time, and so to reduce variability in the experimental data, the cellular population was routinely maintained in the exponential growth phase. Cultures were established at  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> and were then diluted back to this original density when they reached  $30 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>. A stable stationary phase is defined herein by no change in the cell count over 72 h, at which point about 5% of the population were metacyclic trypomastigotes. In experiments in which translation was impaired, cultures of exponentially growing epimastigotes were diluted to  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup> in complete LIT medium containing 100 µg mL<sup>-1</sup> cycloheximide (Sigma). This drug was added to the cultures from a 30 mg mL<sup>-1</sup> stock in 57% ethanol. The drug vehicle concentration in culture was 0.18%.

### Transmission electron microscopy and morphometric analysis

About  $1 \times 10^6$  culture-derived epimastigotes were processed for standard transmission electron microscopy as described earlier (López-Velázquez et al., 2005). Briefly, samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline for 2 h, postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 h, dehydrated using a graded series of ethanol and embedded in epoxy resin. Thin sections were then mounted on copper grids and contrasted using uranyl acetate and lead citrate. Estimates of nucleolar area were derived from digital images of whole nuclei analysed using IMAGEJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The significance of differences in nucleolar size between groups was evaluated using the Mann-Whitney U-test. When three samples were compared, an ANOVA was carried out.

### Transcription assays

Transcription assays were performed according to published methods (Ullu & Tschudi, 1990). Briefly,  $1 \times 10^9$  epimastigotes were harvested from exponentially growing and stationary cultures. These cells were washed twice with buffer A (150 mM sucrose, 20 mM potassium chloride, 3 mM magnesium chloride, 20 mM HEPES-potassium hydroxide (pH 7.9), 1 mM dithiothreitol and 10 µg mL<sup>-1</sup> leupeptin), resuspended in 833 µL of buffer A at a density of  $6 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup> and incubated on ice for 5 min. Epimastigotes were then permeabilized with 250 µg mL<sup>-1</sup> 1- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine palmitoyl for 1 min at 4 °C, washed twice with buffer A and brought to a final volume of 50 µL in buffer A. An equal amount of transcription cocktail buffer (75 mM sucrose, 20 mM potassium chloride, 3 mM magnesium chloride, 1 mM dithiothreitol, 10 µg mL<sup>-1</sup> leupeptin, 25 mM creatinine phosphate, 0.6 mg mL<sup>-2</sup> creatinine kinase, 2 mM ATP, 1 mM CTP and 1 mM GTP) containing 50 µCi of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP was added, followed by incubation at 28 °C. The time course was then monitored by removing 5-µL aliquots at the indicated times (Fig. 1a). Macromolecules were precipitated with cold (4 °C) trichloroacetic acid (TCA) containing 10 µg mL<sup>-1</sup> of carrier tRNA and immobilized on a GF/C filter (Whatman). After these filters were washed with cold 10% TCA and dried, radioactivity was quantified by liquid scintillation. Additionally, a suspension of isolated nuclei was used for the transcription assays. The

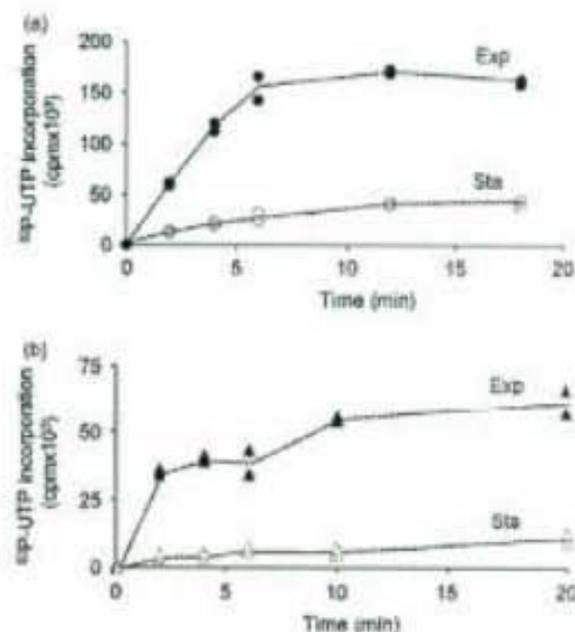
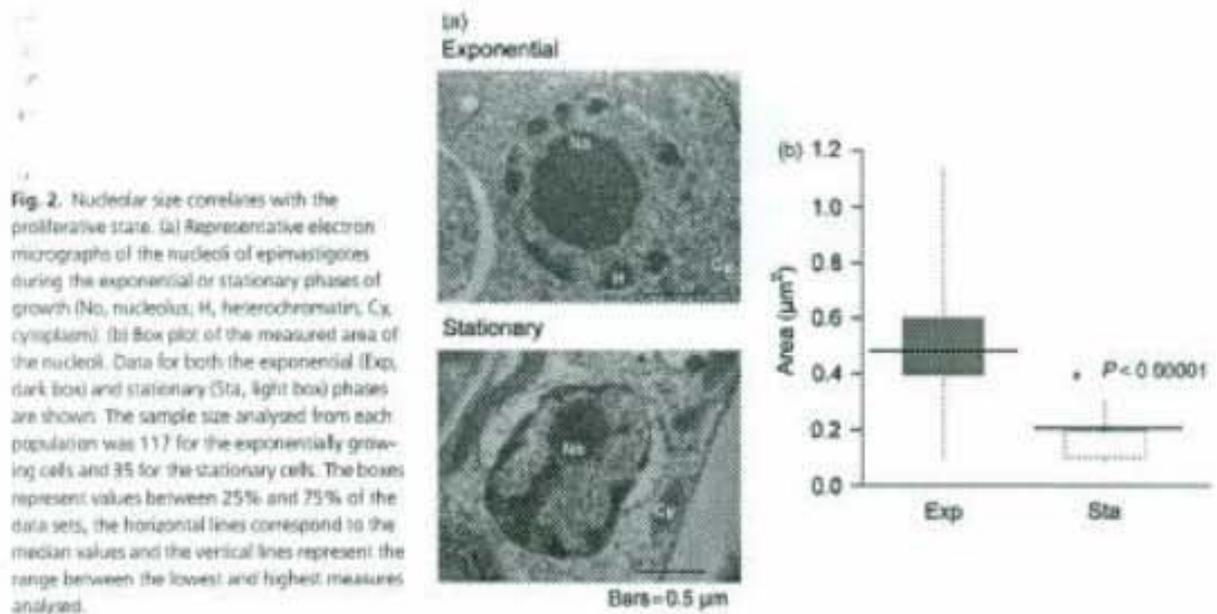


Fig. 1. Transcription activity estimated for cells derived from the exponential (Exp, solid symbols) and stationary (Sta, open symbols) growth phases. (a) Permeabilized cells. (b) Crude nuclear extract. Depicted points correspond to duplicate values of representative experiments.



**Fig. 2.** Nuclear size correlates with the proliferative state. (a) Representative electron micrographs of the nuclei of epimastigotes during the exponential or stationary phases of growth (No, nucleolus; H, heterochromatin; Cy, cytoplasm). (b) Box plot of the measured area of the nucleoli. Data for both the exponential (Exp, dark box) and stationary (Sta, light box) phases are shown. The sample size analyzed from each population was 117 for the exponentially growing cells and 35 for the stationary cells. The boxes represent values between 25% and 75% of the data sets, the horizontal lines correspond to the median values and the vertical lines represent the range between the lowest and highest measures analysed.

nuclei were prepared essentially according to published methods for a related trypanosomatid (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001).

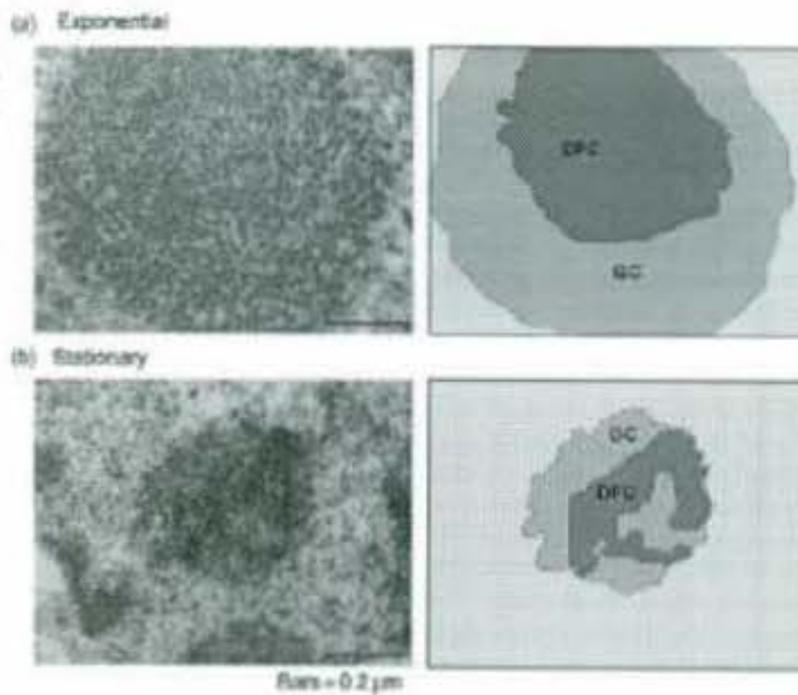
## Results

Axenic cultures of *T. cruzi* epimastigotes undergo an exponential growth phase followed by a logarithmic transition phase before entering the stationary phase, in which the cells stop dividing. To compare the transcription rate (RNA biosynthetic activity) of exponentially growing and stationary epimastigotes under our culture conditions, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-UTP incorporation was measured in cells permeabilized with lysolecithin (Fig. 1a) and in nuclear suspensions (Fig. 1b). In both cases, epimastigotes in the exponential growth phase exhibited higher transcription activity than cells derived from the stationary phase. Relative figures from the initial linear phase of the graphs indicate an approximately sixfold difference in permeabilized cells and 10-fold difference in the nuclear preparations. The higher estimate of activity in the nuclear suspension may be due to faster distribution of reactants in the assay.

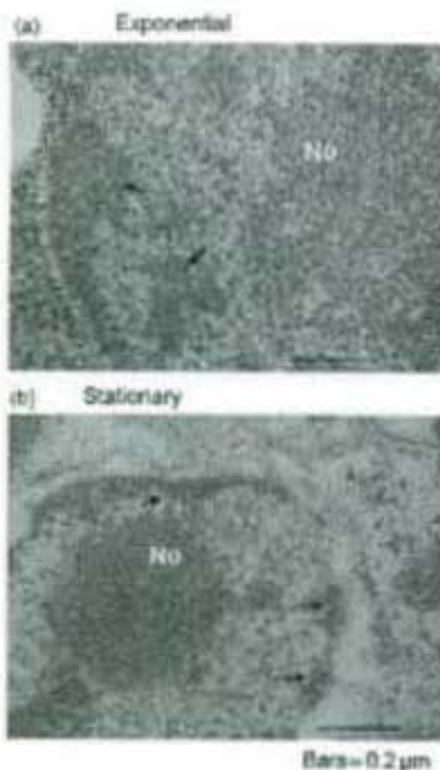
Based on published data, the vast majority of cellular transcription in *T. cruzi* corresponds to rRNA (Elias *et al.*, 2001), which is synthesized in the nucleolus of eukaryotic organisms. Additionally, it is generally accepted that nucleolar organization correlates with cellular proliferation activity. To explore potential size differences in the nucleoli of epimastigotes growing in the exponential and stationary growth phases, nuclei from cultured cells were analysed by standard transmission electron microscopy. The cellular population of exponentially growing epimastigotes included cultures with densities in

the range of  $1 \times 10^7$ – $30 \times 10^8$  cells mL $^{-1}$ , while the stationary-cell category included only cultures whose growth had stopped for at least 72 h. Because a well-structured nucleolus was not observed in the nuclear sections of a large number of cells (i.e. up to 30% of exponentially growing epimastigotes), only nucleoli present as a single granular body were considered in our morphometric analysis, based on previous work (López-Velázquez *et al.*, 2005). Figure 2a depicts representative micrographs of exponential and stationary nuclei in which the nucleolus (No) may be noted. The peripheral heterochromatin is also depicted (H). Figure 2b shows the box-plot distribution of the measured area of the nucleoli, indicating that the median nucleolar area calculated based on exponentially growing cells is significantly larger (> 2-fold,  $P < 0.00001$ ) than that of cells at the stationary phase.

The nucleoli of trypanosomatids are not structured into three different components as in mammalian cells, but rather only into granular and dense fibrillar components (Oghadanyi *et al.*, 2000; López-Velázquez *et al.*, 2005). Here, the granular component is clearly dominant in the nucleoli of exponentially growing cells (Fig. 3a); its presence is less evident in nuclei from the stationary phase (Fig. 3b). In agreement with these differences in nucleolar architecture, a higher density of granules (presumably ribosomes) in the cytoplasm (Cy) of the exponentially growing cells was also noted (Fig. 2a). Regarding the heterochromatin appearance, a closer examination of this nuclear structure is presented in Fig. 4 where a compact and relatively homogeneous material is indicated by arrows. So far we have considered the nucleolus as a fibrogranular structure independent from heterochromatin. Nevertheless, localized interactions between these two nuclear compartments can be observed.



**Fig. 3.** The nucleolar architecture. Selected electron micrographs of nucleoli and their associated cartoons, derived from the exponential (a) or stationary (b) phases. The apparent distributions of the dense fibrillar component (DFC) and the granular component (GC) are represented by dark or light sections, as indicated.

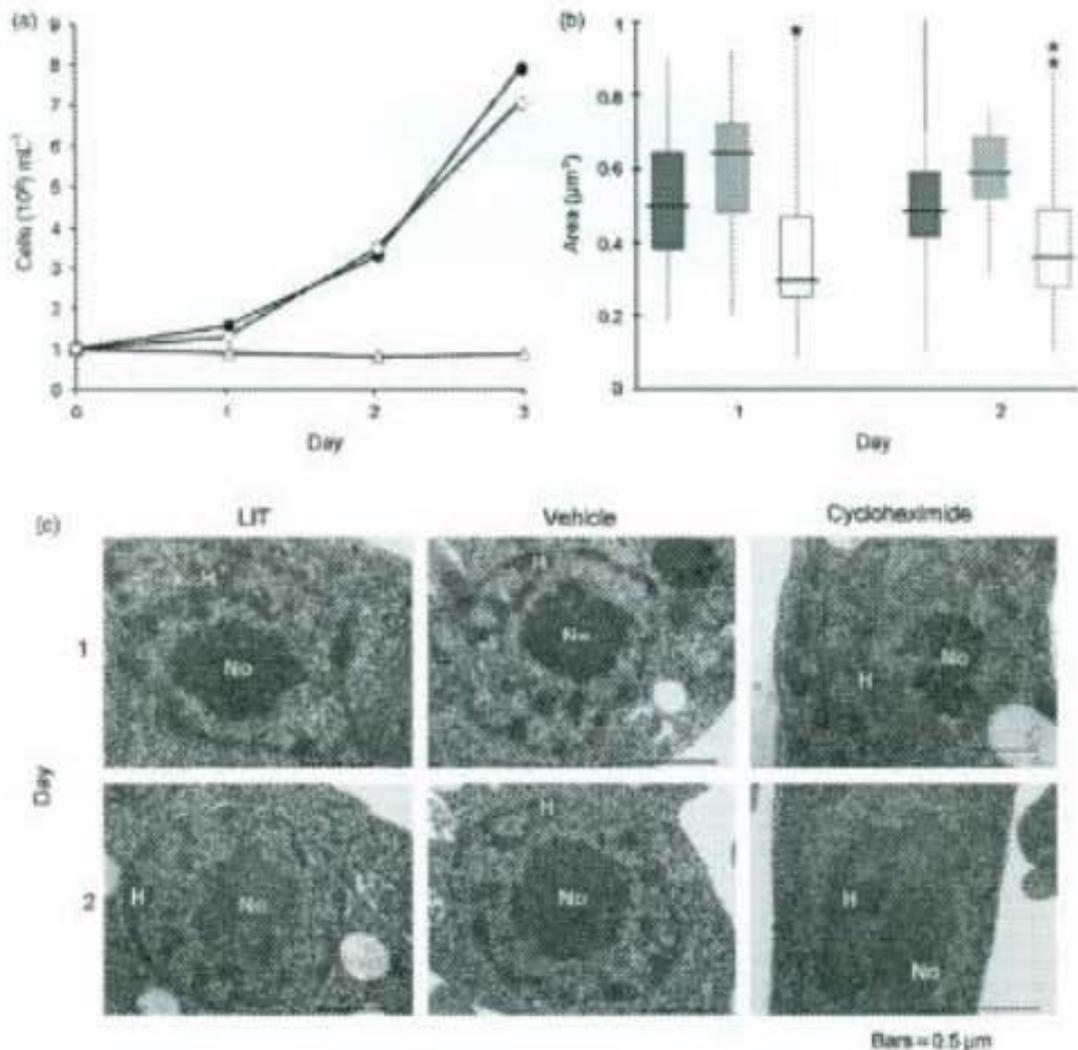


**Fig. 4.** Selected magnifications of nuclear sections. Exponential (a) and stationary (b) phase nuclei are depicted. The arrows indicate the presence of heterochromatin, the nucleoli (No) are also indicated.

The blockade of protein synthesis, as with cycloheximide, results in early alteration of pre-rRNA processing and ribosome formation (Hadjiolov, 1985). Moreover, this drug can profoundly affect nucleolar organization (Ghosh & Paweletz, 1994). To analyse the potential effect of cycloheximide on the nucleolar size of epimastigotes, an exponentially growing culture was diluted and divided into three parts. Cycloheximide was added to one part, the drug vehicle was added to the second part, and the rest of the culture was left untreated. Cellular samples were then processed 1 and 2 days later for nucleolar analysis, as described above. Figure 5a indicates that cells treated with cycloheximide do not grow and that their nucleoli appear slightly smaller than those of control cells (Fig. 5b and c). The growth rate and the nuclear architecture of the cells treated with the drug vehicle were similar to those observed in the untreated control cells. Finally, in terms of transcription, run-on assays showed a fivefold diminished UTP incorporation rate in nuclei isolated from cells treated with cycloheximide for 24 h, as compared with control-cell nuclei (data not shown).

## Discussion

The nucleoli of *T. cruzi* epimastigotes have been previously analysed by electron microscopy (López-Velázquez *et al.*, 2005). More specifically, a spherical, intranuclear fibrogranular organelle was characterized using ultrastructural cytochemical and immunocytochemical techniques. Regarding



**Fig. 5.** Structural effects of cycloheximide on the nucleus. (a) Growth curves of parasites treated with cycloheximide (open triangles), drug vehicle (open circles) and untreated epimastigotes (solid circles). (b) Box plot of the measured area of the nucleus. Values corresponding to cycloheximide-treated cells are represented by open boxes. Dark gray and light gray boxes depict values from LIT or vehicle-treated cultures, respectively. The sample size ( $n$ ) of each group was as follows: LIT, Day 1 (35), Day 2 (41); Vehicle, Day 1 (16), Day 2 (18); Cycloheximide, Day 1 (26), Day 2 (39). (\*) and (\*\*) mark significant differences for cycloheximide treated vs. LIT control comparisons at Day 1 and Day 2, respectively. In both cases  $P$ -value was  $< 0.05$ . No significant differences were found between LIT and vehicle-treated cultures. Please refer to the legend of Fig. 2 for further explanation. (c) Selected electron micrographs of treated and control cells (No, nucleolus; H, heterochromatin).

*T. cruzi* nucleolus formation, it has been reported that this organelle is only structured in well-defined developmental stages in which *T. cruzi* proliferates (Elias *et al.*, 2001), because proliferation demands vigorous cellular transcription and translation. To address the link between cellular proliferation, metabolic activity and ribosome biosynthesis in *T. cruzi*, it is important to establish such basic parameters as transcription rate and nucleolar size. The *in vitro* growth curve of epimastigotes represents a viable system for attaining these goals.

Because rRNA transcription represents the vast majority of transcription in *T. cruzi* (Elias *et al.*, 2001), it is likely that the

difference in the total transcription rate between exponentially growing and stationary cells, observed here, mainly represents distinctive rRNA-related biosynthetic activity. The transcription activity in *T. cruzi* cultures at stationary phase has been analysed earlier, but the published reports show an apparent incomplete or contradictory data. On the one hand, there is a report with the statement of an observed reduced transcription activity for noninfective *T. cruzi* forms at stationary phase, but the data is not shown (Elias *et al.*, 2001). In contrast, in a second publication it is claimed that epimastigotes at stationary phase sustain a high transcription activity derived by RNA polymerase II (Ferreira *et al.*, 2008),

nevertheless the contribution of RNA polymerase I is not discussed. In any case, the results presented here agree with the first statement (Elias et al., 2001). Because the transcription sustained by RNA polymerase I represents the main transcription activity in *T. cruzi*, transcription of ribosomal genes (rRNA) in this species may be coregulated with cellular proliferation status, and not only with development (Elias et al., 2001). A link between cell growth and the transcription of rRNA genes is likely evolutionarily conserved because it has been noted in other eukaryotic species, including vertebrate cells (Moss et al., 2007).

In most eukaryotes, the transcription of tandem arrays of reiterated rRNA genes results in organization of the nucleolus (reviewed in Hadjiolov, 1985). The *T. cruzi* genome harbours around 110 copies of rRNA genes (Castro et al., 1981) clustered with spacers longer than 20 kb (Hernández & Castañeda, 1983). In the present work, our comparison of nucleoli from growing and stationary cells revealed that nucleoli area is significantly larger during exponential growth. The granular preponderance of nucleoli and cytoplasm in actively dividing cells most likely reflects the abundance of preribosomes and ribosomes under these physiological conditions. Regarding nuclear analysis of cells treated with cycloheximide, treated cells presented a moderate reduction in their nucleoli's sizes without an apparent disruption of their architecture.

Finally, we emphasize that numerous reports demonstrate significant variety in rRNA gene organization in the nuclear genome of eukaryotic microorganisms (reviewed in Torres-Machorro et al., 2010). In contrast, the description of potential nucleolar changes associated with differences in growth conditions is a virtually unknown field in the biology of *T. cruzi* and similarly remarkable organisms.

## Acknowledgements

We thank Juliana Herrera López and Norma Espinosa for technical assistance and Alejandro Hernández-López for numerical analysis. T.N.-M. is a recipient of a graduate scholarship from CONACYT México. This work was also partly supported by Grants IN213708 and IN228810-3 from DGAPA PAPIIT UNAM and Grant 99062 from CONACYT-Mexico to Roberto Hernández.

## References

- Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypomastotes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **12**: 93–100.
- Castro C, Hernández R & Castañeda M (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecular mass species and number of genes. *Mol Biochem Parasitol* **2**: 219–233.
- Elias MC, Marques-Porto R, Freymüller E & Schenkman 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.
- Ferreira LR, Damin F de M, Ramos TC, Freymüller E & Schenkman S (2008) Active transcription and ultra structural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Acta Bras Genet* **80**: 157–166.
- Figuerwa-Angulo E, Cevallos AM, Zentella A, López-Villaseñor I & Hernández R (2006) Potential regulatory elements in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter. *Biochim Biophys Acta* **1759**: 497–501.
- Ghosh S & Pawletta N (1994) Nucleolar organization as revealed in cycloheximide treated cells. *Cell Biol Int* **18**: 783–788.
- Hadjiolov AA (1985) *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis* (Cell Biology Monographs), 1st edn. Springer Verlag/Wien, New York.
- Haik S & Papadopoulos B (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* **10**: 569–577.
- Hernández R & Castañeda M (1983) An endonuclease restriction analysis of the ribosomal RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **8**: 305–315.
- Hernández R, Martínez-Cabrillo S, Hernández-Rivas R & Gómez E (1993) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol Res* **26**: 190–114.
- López-Velázquez G, Hernández R, López-Villaseñor I, Reyes-Vivas H, Segura-Valdez M de L & Jiménez-García LF (2005) Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal* **11**: 293–299.
- Martínez-Cabrillo S, Sunkin SM, Yan S, Fox AL, Stuart K & Myler PJ (2001) Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Mol Biochem Parasitol* **114**: 147–157.
- Moss T, Langlois F, Gagnon-Kugler T & Steizmovsky V (2007) A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* **64**: 29–49.
- Oybakçi E, Erufeld K, Robinson D, Sherwin T & Gull K (2000) Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma* **108**: 501–513.
- Teizira SM (1980) Control of gene expression in *Trypanosomatidae*. *Braz J Med Biol Res* **31**: 1503–1516.
- Torres-Machorro AL, Hernández R, Cevallos AM & López-Villaseñor I (2010) rRNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiol Rev* **34**: 39–66.
- Tyler KM & Engman DM (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* **31**: 472–481.
- Ulls E & Tschudi C (1990) Permeable trypanosome cells as a model for transcription and trans-splicing. *Nucleic Acids Res* **18**: 3319–3326.