



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTRÉS CALÓRICO EN *Trypanosoma cruzi*:
ANÁLISIS PROTEÓMICO Y
CARACTERIZACIÓN DEL GEN SHSP16

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
DEYANIRA PÉREZ MORALES



Tutor: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ

MÉXICO, D. F.

Agosto 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTRÉS CALÓRICO EN *Trypanosoma cruzi*: ANÁLISIS PROTEÓMICO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN SHSP16

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el laboratorio de Tripanosomiasis, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Ruy Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. María del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Pedro Ostoa Saloma, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de caracterización del gen SHSP16.

Se reconoce la colaboración del Dr. Humberto Lanz Mendoza y del Q. Gerardo Hurtado, de la Dirección de Enfermedades Transmitidas por Vector del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de MALDI-TOF.

Se reconoce la asesoría técnica del M. en C. Ignacio Martínez Martínez en los experimentos de cultivo de parásitos de *Trypanosoma cruzi*.

Se reconoce la asesoría técnica de Gerardo Arrellín Rosas en los experimentos de sangrado de cobayos para la obtención de anticuerpos policlonales.

Se reconoce la asesoría de la Dra. Laura Camarena Mejía.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (47822-Q). Durante los estudios de Maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día de Agosto de 2007.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Carmen Gómez Eichelmann	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Pedro Ostoa Saloma	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. Ruy Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, por la confianza que tuvo en mí.

Al Dr. Pedro Ostoa Saloma, porque sin su fundamental interés y apoyo no habría empezado la parte del proyecto que más me entusiasmó.

A los miembros de mi comité tutorial y del jurado, por el tiempo que dedicaron a la revisión de mi tesis, así como por sus valiosas aportaciones.

A la Dra. Rosalía Lira Carmona, por todas sus constructivas observaciones.

Al Pasante de Doctorado Fernando Martínez Hernández, por todo lo que me enseñó y ayudó en la parte de biología molecular.

A la M. en C. María Luisa Martínez Velasco, por enseñarme todas las técnicas relacionadas con el análisis proteómico.

Al M. en C. Ignacio Martínez Martínez, por su apoyo técnico y las discusiones sobre el proyecto.

A Rodrigo, por todas sus pequeñas grandes contribuciones y sugerencias que me ayudaron a construir parte de este trabajo, por su extraordinario apoyo en todo momento.

A Tecilli, Gerry, Ernesto, Fer y Dany,
por enriquecer esta etapa de mi vida tanto personal como académicamente.

A la UNAM, nuestra maravillosa casa de estudios, porque todo me lo ha dado y es un orgullo pertenecer a ella.

*A mis padres,
por todo el amor y la comprensión que siempre me han entregado.
Por impulsar todos mis proyectos y decisiones
y guiarme con su experiencia.*

*A mi hermano Moisés,
por ser quien quiere ser e inculcarme su ejemplo,
por sujetar mi mano siempre que lo he necesitado.*

*A mi sobrino Paulo Tristán,
por iluminarnos en los días más soleados y en los más oscuros,
con su brillante luz.*

*Quae medicamenta non sanat, ferrum sanat.
Quae ferrum non sanat, ignis sanat.
Quae vero ignis non sanat,
insanabilia reportari oportet.*

(Lo que la medicina falla en curar, el bisturí lo puede curar.
Lo que el bisturí no puede curar, el calor puede curarlo.
Lo que el calor no puede curar,
debe ser declarado como incurable).

Hipócrates.

ÍNDICE

RESUMEN

ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN

- 1.1. *Enfermedad de Chagas*
 - 1.1.1. Transmisión
 - 1.1.2. Manifestaciones clínicas
- 1.2. *Trypanosoma cruzi*
 - 1.2.1. Taxonomía
 - 1.2.2. Genética
 - 1.2.3. Morfología
 - 1.2.4. Ciclo de vida
- 1.3. *Condiciones de estrés en el parásito*
- 1.4. *Estrés calórico*
- 1.5. *Proteínas de estrés calórico*
 - 1.5.1. Familias de proteínas de estrés calórico
 - 1.5.2. α -HSPs

II. ANTECEDENTES

- 2.1. *Respuesta al estrés calórico en distintos organismos*
- 2.2. *Respuesta al estrés calórico en T. cruzi*
- 2.3. *Familias de proteínas de estrés calórico en T. cruzi*

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IV. HIPÓTESIS

V. OBJETIVOS

- Objetivo general
- Objetivos particulares

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

- 6.1. *Cepas y plásmidos utilizados*
- 6.2. *Condiciones de cultivo*
 - 6.2.1. *T. cruzi*
 - 6.2.2. *E. coli*
- 6.3. *Análisis proteómico*
 - 6.3.1. Ensayo de estrés calórico
 - 6.3.2. Extracción total de proteínas
 - 6.3.3. Cuantificación de proteínas
 - 6.3.4. Rehidratación de tiras IPG
 - 6.3.5. Isoelectroenfoque (IEF)
 - 6.3.6. Equilibrio de tiras

- 6.3.7. Electroforesis de proteínas (segunda dimensión)
- 6.3.8. Tinción con nitrato de plata
- 6.3.9. Captura y análisis de imágenes
- 6.3.10. Tinción con plata compatible con espectrometría de masas
- 6.3.11. Identificación de proteínas mediante huella peptídica (PMF)
- 6.3.12. Búsqueda en la base de datos

6.4. *Análisis molecular*

- 6.4.1. Análisis de secuencias
- 6.4.2. Modelamiento molecular
- 6.4.3. Extracción de DNA total de *T. cruzi*
- 6.4.4. Extracción de RNA total de *T. cruzi*
- 6.4.5. Amplificación del gen SHSP16
- 6.4.6. Clonación de SHSP16 en el vector pCR2.1
- 6.4.7. Transformación de pCR2.1 en células de *E. coli*
- 6.4.8. Extracción de DNA plasmídico
- 6.4.9. Digestión del vector pCR2.1
- 6.4.10. RT-PCR semicuantitativo
- 6.4.11. Clonación de SHSP16 en pET23a
- 6.4.12. Sobreexpresión de la proteína recombinante
- 6.4.13. Purificación de la proteína recombinante
- 6.4.14. Electroforesis
- 6.4.15. Producción de anticuerpo policlonal anti-SHSP16
- 6.4.16. Análisis de Western blot
- 6.4.17. Ensayos de actividad de chaperona

VII. RESULTADOS

VII.I. ANÁLISIS PROTEÓMICO

- 7.1.1. Efecto del estrés calórico sobre la movilidad de los parásitos
- 7.1.2. Proteoma de *T. cruzi* en condiciones de estrés calórico
- 7.1.3. Identificación de proteínas por huella peptídica

VII.II. ANÁLISIS MOLECULAR

- 7.2.1. Identificación del gen *SHSP16* en *T. cruzi*
- 7.2.2. Amplificación y secuenciación del gen *SHSP16*
- 7.2.3. Análisis de la secuencia nucleotídica
- 7.2.4. Predicción de estructura secundaria
- 7.2.5. Análisis de la secuencia de aminoácidos
- 7.2.6. Expresión del mRNA de *SHSP16* en respuesta al estrés calórico
- 7.2.7. Expresión y purificación de la proteína SHSP16
- 7.2.8. Análisis de Western blot
- 7.2.9. Actividad de chaperona *in vitro* de SHSP16
- 7.2.10. Modelamiento de SHSP16

VIII. DISCUSIÓN

VIII.I. ANÁLISIS PROTEÓMICO

- 8.1.1. Inducción de la respuesta de estrés calórico en epimastigotes
- 8.1.2. Proteoma de *T. cruzi* en condiciones de estrés calórico
- 8.1.3. Identificación de proteínas por huella peptídica
 - 8.1.3.1. Proteínas de respuesta al estrés y degradación
 - 8.1.3.2. Metabolismo

- 8.1.3.3. Traducción de proteínas
- 8.1.3.4. Transporte intracelular
- 8.1.3.5. Proteínas de superficie
- 8.1.3.6. Proteínas hipotéticas y otras proteínas

VIII.II. ANÁLISIS MOLECULAR

- 8.2.1. Identificación del gen *SHSP16*
- 8.2.2. Análisis de la secuencia nucleotídica
- 8.2.3. Análisis de la secuencia de aminoácidos
- 8.2.4. Expresión del mRNA y de la proteína SHSP16 en estrés calórico
- 8.2.5. Oligómeros de SHSP16
- 8.2.6. Actividad de chaperona *in vitro* de SHSP16
- 8.2.7. Modelamiento de SHSP16

IX. CONCLUSIONES

X. PERSPECTIVAS

XI. REFERENCIAS

XII. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo y antibióticos

Anexo 2. Soluciones generales

Anexo 3. Soluciones SDS-PAGE

Anexo 4. Soluciones Biología molecular

RESUMEN

La respuesta al estrés constituye un mecanismo homeostático ampliamente distribuido en los organismos. En el caso del estrés calórico, uno de los eventos tempranos que se presenta es la desnaturalización masiva de proteínas, con su consecuente pérdida de actividad biológica, en tales condiciones, los organismos deben activar mecanismos celulares adaptativos que les permitan contrarrestar dichos efectos. En *Trypanosoma cruzi*, el estudio de la respuesta al estrés calórico es de suma importancia debido a que el incremento en la temperatura es una parte integral de su ciclo de vida. Además, el estrés calórico no es el único tipo de estrés al que tiene que enfrentarse el parásito constantemente, por lo que el estudio de la respuesta al estrés en general en *T. cruzi* es indispensable.

En el presente trabajo, la respuesta al estrés calórico en *T. cruzi* fue abordada a través de dos enfoques distintos, uno general y otro específico. En el enfoque general se realizó un análisis proteómico preliminar mediante la comparación del proteoma de *T. cruzi* en condiciones control y de estrés calórico, que permitió la identificación de diversas proteínas asociadas a funciones específicas, de las que de algunas se ha reportado su modulación tras un estrés calórico en otros organismos. El segundo análisis, más particular, estuvo enfocado a la caracterización de una sola proteína perteneciente a la clase de chaperonas moleculares de bajo peso molecular, a la que se nombró SHSP16. Debido a que en *T. cruzi* no se había reportado antes la existencia de esta clase de proteínas, fue de nuestro interés determinar su presencia en el genoma del parásito. La caracterización del gen *SHSP16* en *T. cruzi* abre la posibilidad de iniciar un estudio más profundo sobre la función biológica que este tipo de proteínas pueda tener en parásitos Tripanosomátidos. En general, ambos análisis permitieron obtener un tipo de información distinta que contribuye al conocimiento de la respuesta al estrés en *T. cruzi*.

I. INTRODUCCIÓN

En el grupo de microorganismos eucariontes conocidos como protozoarios, existen varias especies que son agentes etiológicos de enfermedades relevantes en el hombre, dada su incidencia y patología, entre ellos, *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la enfermedad de Chagas.

1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una zoonosis que se localiza exclusivamente en el Continente Americano, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile (Figura 1.1), es por esto que también se le conoce como Tripanosomiasis americana (Dias, 1992).

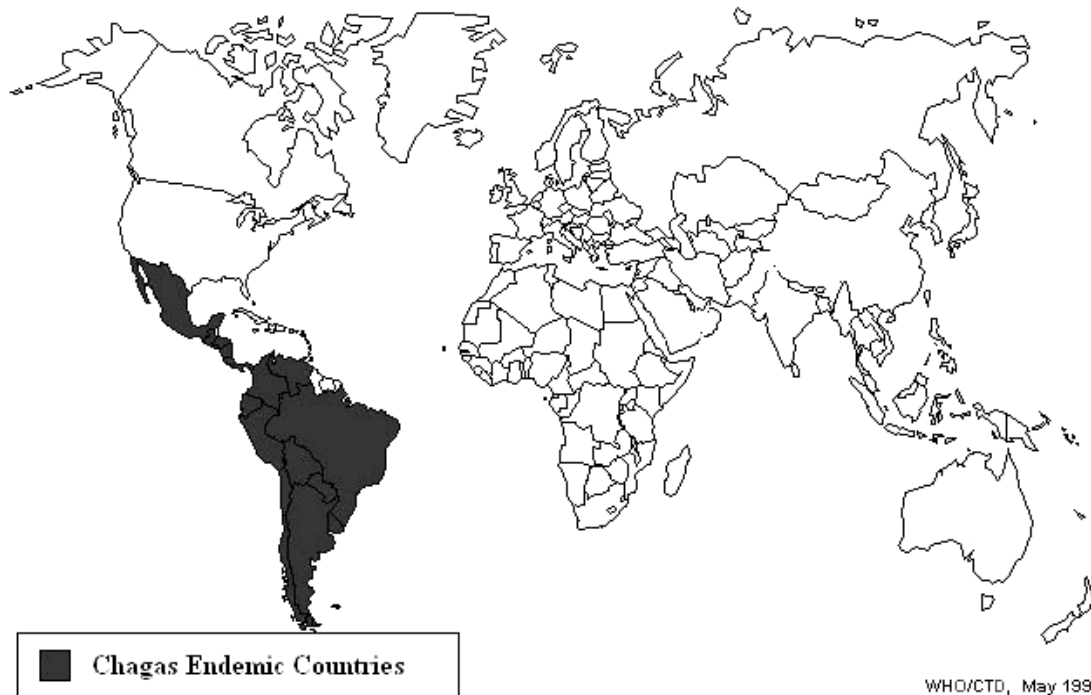


Figura 1.1. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas. Al ser endémica del Continente Americano, también se le conoce como Tripanosomiasis americana. Tomado de <http://www.who.int/ctd/chagas/geo.htm>.

Dicho padecimiento constituye un gran problema de salud, estimándose que de 16 a 18 millones de personas están infectadas en toda América y que otros 100 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2002). Adicionalmente, cada año se registran aproximadamente 20 000 muertes por dicho padecimiento (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm>). Hasta el momento,

no existe ningún agente quimioterapéutico inocuo, ni ninguna vacuna preventiva efectiva contra la infección por el parásito.

La enfermedad recibe su nombre en honor del Dr. Carlos Chagas, el médico brasileño que la descubrió en 1909 (Wendel y Brener, 1992).

1.1.1. Transmisión

Existen diversas formas de adquirir la enfermedad. El mecanismo natural implica la transmisión a través de las heces de una chinche infectada. Al ser un patógeno que se localiza en la sangre, es posible infectarse mediante transfusiones sanguíneas o transplantes de órganos. La transmisión congénita también se observa hasta en un 10%. Ocasionalmente, la infección se adquiere mediante la ingesta de material contaminado con el parásito. Los mamíferos que actúan como reservorio frecuentemente adquieren la enfermedad al comer chinches infectadas (Storino y Jörg, 1994).

1.1.2. Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico de la enfermedad se ha dividido en tres etapas, cada una con síntomas característicos: la fase aguda, la indeterminada y la crónica. Inmediatamente a la infección se presenta la fase aguda de la enfermedad, la cual es generalmente corta (1-2 semanas), y que en menos del 5% de los casos puede ocasionar un estado febril agudo que llega a ser fatal. La infección procede a una fase indeterminada que es clínicamente asintomática. Después de varios años o décadas puede aparecer la fase crónica, que se manifiesta en el 30% de los casos. En ésta se observan una variedad de sintomatologías clínicas que incluyen anomalías en el tracto digestivo como sería el desarrollo de megacolon o megaeosófago y/o el agrandamiento y malfuncionamiento cardiaco (megacardio y cardiomiopatías) (Storino y Jörg, 1994). Algunas personas pueden infectarse y nunca presentar algún síntoma (Dias, 1992).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

1.2.1. Taxonomía

T. cruzi es un protozoario que taxonómicamente pertenece al super reino Eukaryota, clase Euglenozoa, orden Cinetoplástida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*, especie *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>) (Figura 1.2). Todos los miembros del orden Cinetoplástida poseen un organelo particular que los define, el cinetoplasto, el cual está constituido por DNA extranuclear localizado en un punto específico de la mitocondria (De Souza, 2002a).

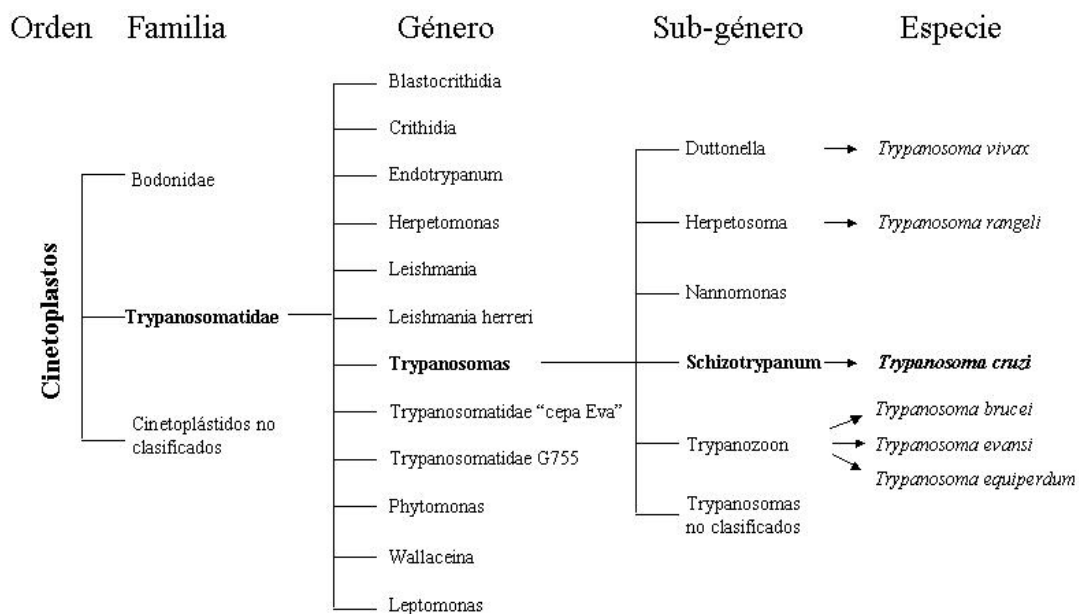


Figura 1.2. Taxonomía de *T. cruzi*. Además del género *Trypanosoma*, en la familia Trypanosomatidae se agrupan otros géneros de protozoarios que son parásitos de distintos organismos. Tomado de Cevallos y Hernández, 2001.

1.2.2. Genética

A pesar de que *T. cruzi* constituye un taxon, su población presenta una gran heterogeneidad genotípica y fenotípica (Tibayrenc, 1993), por lo que se le ha dividido, utilizando polimorfismos y variaciones en marcadores genéticos y fenotípicos, en dos grupos genéticos principales, *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Souto *et al.*, 1996; Tibayrenc, 1995). Mientras que *T. cruzi* I se encuentra asociado con el ciclo de transmisión selvático e infección de marsupiales, *T. cruzi* II está asociado al ciclo de transmisión

doméstico e infección de mamíferos (El-Sayed *et al.*, 2005b), aunque ambos grupos son potencialmente patogénicos para el hombre (De Souza, 2002b).

El modo de replicación de éste parásito es principalmente clonal y la variabilidad genética y biológica que presenta puede ser el resultado de la evolución de múltiples clonas independientes (Souto *et al.*, 1996).

El genoma haploide de *T. cruzi* (55 Mb) está distribuido en aproximadamente 28 cromosomas y posee alrededor de 12 000 genes codificadores de proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005a).

1.2.3. Morfología

El parásito presenta diversos estadios de desarrollo a lo largo de su ciclo de vida que son relativamente fáciles de identificar y dentro de los cuales se distinguen al menos a tres formas morfológicamente distintas principales: amastigote, tripomastigote y epimastigote (Brener, 1992) (Figura 1.3).

Los amastigotes poseen una forma esférica, son intracelulares, con muy poca movilidad y capaces de dividirse por fisión binaria. Miden de 2-4 μm . El cinetoplasto se observa como un cuerpo oscuro cerca del núcleo. No poseen flagelo libre y carecen de membrana ondulante (González Cappa y Durante de Isola, 1994) (Figura 1.3A). Se ha determinado que también tienen la capacidad de infectar células del vertebrado (De Souza, 2002b). *In vitro*, se obtienen a partir de la transformación de tripomastigotes en medio de cultivo ácido (Brener, 1992).

Los tripomastigotes miden 25 μm de longitud y tienen un diámetro aproximado de 2 μm . El cinetoplasto se localiza en la parte posterior al núcleo, usualmente en la porción más posterior del parásito. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el organismo y emerge en forma libre en su extremo anterior (Cevallos y Hernández, 2001) (Figura 1.3B). Esta forma es infectiva y carente de capacidad replicativa. *In vivo*, se localizan en los tejidos o en la sangre de hospederos vertebrados infectados. *In vitro*, se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento de cultivos del parásito axénicos (epimastigotes) y en la fase líquida de cultivos celulares (De Souza, 2002a) (Figura 1.3B).

Los epimastigotes tienen forma de huso, miden de 20-40 μm de largo, su cinetoplasto se localiza en la parte anterior al núcleo y se replican mediante fisión

binaria (De Souza, 2002a). El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña que la observada en los tripomastigotes (Cevallos y Hernández, 2001) (Figura 1.3C). *In vivo*, estas formas se encuentran en el intestino del hospedero invertebrado y también dentro del hospedero vertebrado hacia el final del ciclo intracelular cuando los amastigotes se transforman a tripomastigotes o al inicio de un nuevo ciclo, cuando los tripomastigotes se transforman a amastigotes. *In vitro*, proliferan logarítmicamente en cultivos axénicos (De Souza, 2002b) (Figura 1.3C). Estas formas son por mucho las más ampliamente usadas en los experimentos de laboratorio (Fernandes *et al.*, 2005; Finzi *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 1994; Requena *et al.*, 1988), debido en parte a la facilidad de obtener un gran número de células y a la menor infraestructura requerida.

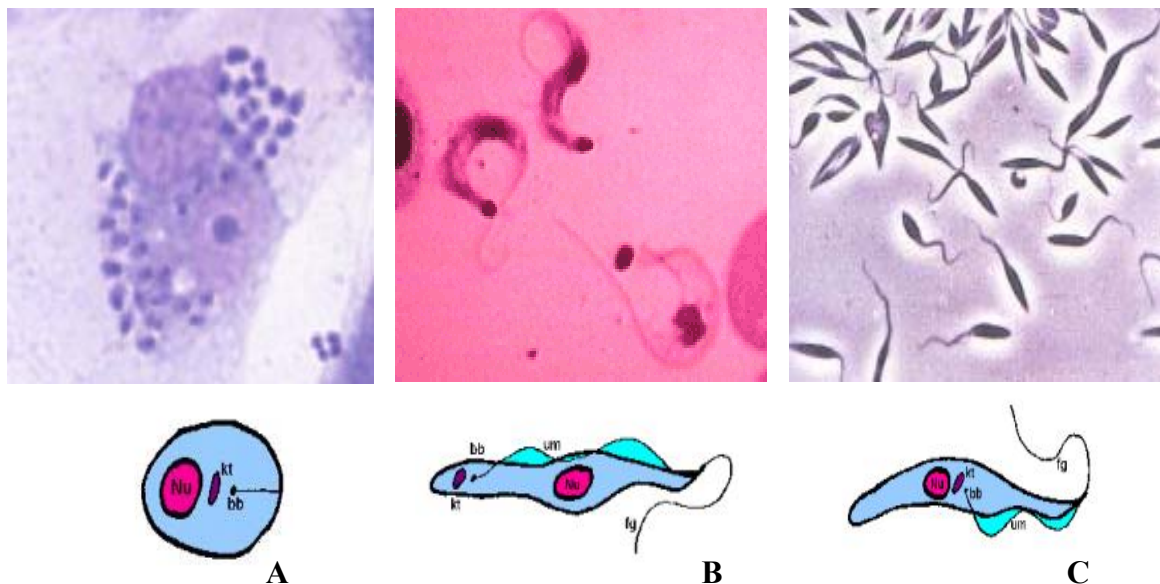


Figura 1.3. Micrografías de luz y representación esquemática de los principales estadios de desarrollo de *T. cruzi*. Los tres estadios son: A) amastigote; B) tripomastigote; y C) epimastigote, cada uno con características morfológicas particulares. Las micrografías de luz fueron tomadas de amastigotes intracelulares (<http://students.vetmed.vt.edu/2008/parasit.html>); de tripomastigotes sanguíneos obtenidos de un frotis (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tcal/images/tcruz.gif>); y de epimastigotes de *T. cruzi* en pleno crecimiento en medio de cultivo líquido LIT (<http://www.cienciahoy.org.ar/hoy02/trypanosoma.htm>). Las representaciones esquemáticas inferiores fueron modificadas de Cevallos y Hernández, 2001. Nu, núcleo; kt, cinetoplasto; bb, cuerpo basal; um, membrana ondulante; fg, flagelo.

1.2.4. Ciclo de vida

T. cruzi presenta un complejo ciclo de vida en el que alterna sus distintos estadios de desarrollo entre dos hospederos distintos, el vector y el reservorio, por lo que es un organismo digenético. El parásito es transmitido por hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae que actúan como vectores u hospedero invertebrado y dentro de los cuales se han descrito a más de 110 especies (Dias, 1992). Son chinches de aproximadamente 3 cm de largo (el tamaño depende de la especie) que se alimentan de sangre durante la noche. En el caso de los reservorios u hospedero vertebrado, se han descrito a más de 100 diferentes especies de animales salvajes y domésticos, incluido el hombre, como susceptibles de ser infectados (Durante de Isola y González Cappa, 1994).

Así, el ciclo de vida del parásito (Figura 1.4) comienza cuando un vector sin infectar se alimenta de un vertebrado infectado, que tiene tripomastigotes circulando en su torrente sanguíneo, los cuales son ingeridos por el vector (De Souza, 2002b). Dentro de la chinche y a lo largo de su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones antes de ser expulsado en las heces (Brenner, 1992). En el estómago del insecto, la mayoría de los tripomastigotes ingeridos se transforman a epimastigotes y algunos se redondean formando amastigotes. A mitad del intestino, los epimastigotes se replican mediante fisión binaria, los cuales se adhieren a las células del intestino mediante hemidesmosomas (De Souza, 2002a). Finalmente, aproximadamente 2 semanas después llegan al recto, donde una cierta proporción de los epimastigotes se convierten en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son eliminados en las heces y la orina del vector. De esta forma, el ciclo se cierra cuando el vector infectado es ahora capaz de transmitir el parásito a un hospedero vertebrado. La transmisión se produce mientras el vector se alimenta, ya que al estarse alimentando, las chinches defecan, depositando en las heces y orina a los tripomastigotes metacíclicos, los cuales son incapaces de atravesar la piel intacta, por lo que entran en el organismo a través de excoriaciones de la piel o a través de las mucosas. Generalmente, las excoriaciones son formadas por el proceso de rascado en el sitio de la picadura y en ese proceso, las heces y con ella los tripomastigotes, son arrastrados hacia el interior. Una vez dentro del hospedero vertebrado, los tripomastigotes pueden invadir prácticamente cualquier tipo de célula nucleada (fagocítica y no fagocítica), aunque tienen una marcada preferencia por células musculares cardíacas, macrófagos, neuronas y tejido glial (células de soporte

del sistema nervioso) (González Cappa y Durante de Isola, 1994). En el proceso de invasión hay una fase de reconocimiento y una de penetración. Seguido el reconocimiento, los tripomastigotes capaces de entrar a la célula parasitada son encapsulados en una vacuola parasitófora, de la cual escapan después de un tiempo (hasta varias horas) hacia el citosol (Hall, 1993). Una vez en el citoplasma, los tripomastigotes pierden su flagelo y se transforman a amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotes casi llenan la célula, se transforman a tripomastigotes y tras romper la célula, son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, donde tienen la capacidad de invadir otras células, en las que se transformarán de nuevo en amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección (Brenner, 1992).

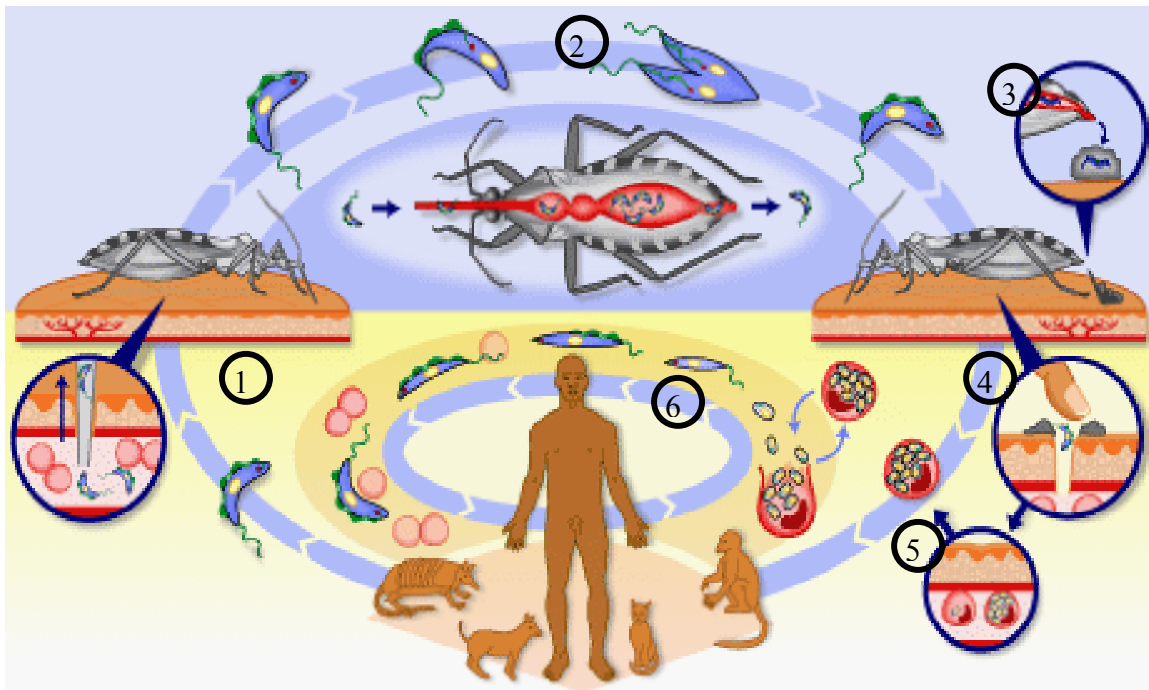


Figura 1.4. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Al alternar su ciclo de vida en dos hospederos distintos, el invertebrado y el vertebrado, es un organismo digenético. El ciclo comienza cuando una chinche no infectada se alimenta de un vertebrado infectado (1), ingiriendo tripomastigotes, los cuales después de una serie de transformaciones se convierten en tripomastigotes metacíclicos (2). Éstos últimos son depositados en las heces (3) y el ciclo finaliza cuando ésta chinche infectada transmite el parásito a un vertebrado no infectado (4), en el cual los tripomastigotes metacíclicos se diferencian a amastigotes (5) y nuevamente a tripomastigotes, que pueden invadir otras células indefinidamente (6). Modificado de <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle/htm>.

1.3. Condiciones de estrés en el parásito

Al ser un parásito digenético, el ciclo de vida de *T. cruzi* involucra la supervivencia en dos hospederos distintos (Figura 1.4), cuyas características fisiológicas son heterogéneas (Requena *et al.*, 1992). De esta forma, el parásito se encuentra expuesto a condiciones de crecimiento que difieren significativamente entre el vector y el hospedero vertebrado en aspectos como la temperatura, el pH, la disponibilidad de nutrientes, el potencial redox, etc., los cuales representan un estrés celular (Graefe *et al.*, 2002; Zilberstein y Shapira, 1994). Asimismo, una vez dentro del vector o del vertebrado, el parásito está expuesto a una serie de fluctuaciones que involucran cambios asociados con el cambio de un ambiente extracelular a uno intracelular o con la respuesta inmune del hospedero (Zilberstein y Shapira, 1994). En la célula mamífera, el parásito experimenta una exposición a pH ácido, pues la vacuola parasitófora se acidifica con el tiempo (Hall, 1993), así como una exposición a radicales libres, los cuales son parte del mecanismo de defensa que la célula hospedera desarrolla (Finzi *et al.*, 2004). Algunas de estas alteraciones pueden llevar a la muerte celular, por lo que, al igual que muchos otros parásitos, *T. cruzi* ha desarrollado mecanismos que le permiten sobrevivir y multiplicarse bajo diversas condiciones ambientales. Estas adaptaciones resultan en la alteración de la expresión genética de los organismos que es modulada por los factores que representan choques ambientales (Zilberstein y Shapira, 1994).

El paso de un hospedero a otro, expone a *T. cruzi* a distintas temperaturas de crecimiento. En el caso de los insectos, al ser organismos poiquiloterms, la temperatura de su cuerpo puede variar dramáticamente dependiendo de la temperatura del ambiente (Feder, 1999). En el hospedero mamífero, el rango de temperatura que puede encontrar el parásito va de 37°C (humano) a 40.5°C en animales domésticos (bovinos, cerdo) y silvestres (armadillo) (Escobar y Amezcua, 1981). Asimismo, estos organismos pueden sufrir estados febriles agudos como consecuencia de la enfermedad de Chagas que lleven a un aumento significativo en la temperatura corporal interna, la cual puede alcanzar por lo tanto, 42°C. Así, uno de los principales factores ambientales a los que tiene que exponerse el parásito durante el transcurso de su ciclo de vida es al cambio brusco en la temperatura, la cual pasa de 22-28°C cuando está en el vector, a temperaturas de más de 37°C una vez que ha entrado al hospedero mamífero, generándose en éste proceso un estrés calórico o choque térmico (Olson *et al.*, 1994).

1.4. Estrés calórico

El estrés calórico no letal es producido cuando hay un incremento repentino en la temperatura del ambiente, éste genera una serie de cambios específicos en el patrón de la expresión genética y en la función celular de los organismos, desarrollando una respuesta de estrés celular. Constituye el estímulo más ampliamente utilizado para modelar el impacto del estrés ambiental en los sistemas biológicos (Prohászka y Füst, 2004).

Al ser un tipo de estrés, el choque térmico produce un conjunto de alteraciones en los organismos. Dichas alteraciones son muy diversas e incluyen las siguientes: inhibición de la síntesis y transcripción del DNA, así como la inhibición del procesamiento y traducción del RNA; arresto del ciclo celular; desnaturalización y agregación de las proteínas; alta degradación de proteínas a través de rutas lisosomales y proteasomales; disrupción del citoesqueleto; alteraciones en el metabolismo que provocan una reducción neta del nivel de ATP intracelular; y cambios en la permeabilidad de la membrana que llevan a la acumulación intracelular de iones (Na^+ , H^+ , Ca^{2+}) (Prohászka y Füst, 2004).

Por otro lado, la respuesta al estrés calórico está ampliamente conservada a lo largo de la escala filogenética, constituyendo un mecanismo esencial para la sobrevivencia y que se caracteriza por el incremento en la síntesis de un grupo de proteínas comúnmente conocidas como proteínas de estrés calórico o HSPs, por sus siglas en inglés (**H**eat **S**hock **P**roteins) (Lindquist y Craig, 1988) y por la supresión en la síntesis de muchas otras proteínas (Narberhaus, 2002; Polla, 1991), mientras que otras más serán sintetizadas *de novo* (Slabas *et al.*, 2006). Debido a su inducción en condiciones de estrés calórico es que se les ha llamado tradicionalmente HSPs, sin embargo, también son producidas tanto en otros tipos de estrés como constitutivamente, operando bajo condiciones fisiológicas normales (Narberhaus, 2002).

1.5. Proteínas de estrés calórico

Las proteínas de estrés calórico son una serie de proteínas muy conservadas en todos los organismos y cuya función principal es la de actuar como chaperonas moleculares en el plegamiento, renaturalización, disgregación o proteólisis de los polipéptidos. Las chaperonas han sido definidas como una familia de proteínas celulares que participan en el correcto plegamiento de otros polipéptidos y en algunos casos en su multimerización en estructuras oligoméricas, cuya interacción con otras proteínas es sólo transitoria, pues las proteínas de estrés calórico no son componentes de las estructuras funcionales finales de las proteínas (Narberhaus, 2002). Estas chaperonas moleculares se unen a proteínas sustrato no nativa o parcialmente plegadas para promover su renaturalización, correcto plegamiento o para prevenir su agregación irreversible. También pueden mantener a proteínas sustrato en una conformación no plegada con el fin de facilitar su traslocación a través de las membranas celulares (Waters *et al.*, 1996). Asimismo, al término chaperona se le ha ampliado la clase de sustratos a los cuales puede transportar o plegar correctamente, el cual abarca desde iones metálicos a ácidos nucleicos (Lund *et al.*, 2003).

Durante condiciones de crecimiento normales, un evento crítico en la biogénesis de las proteínas es el de generar una estructura tri-dimensional funcional a través del plegamiento apropiado de la secuencia primaria. Mientras un polipéptido va saliendo del ribosoma, éste puede plegarse incorrectamente, y a pesar de que muchos se plegarán de manera correcta espontáneamente, algunos otros no lo harán y necesitarán la asistencia de chaperonas. Otros polipéptidos no podrán ser plegados correctamente aún con la ayuda de chaperonas y serán degradados. Dentro de éstas condiciones constitutivas, las chaperonas moleculares actúan en el sistema de control de calidad de las proteínas tanto co-traduccionalmente como post-traduccionalmente. Sin embargo, en condiciones de estrés calórico, la gran parte de las proteínas que están siendo sintetizadas necesitan ahora ser plegadas con la ayuda de las chaperonas. Además, en dicha condición, debido a que muchas de las proteínas pre-existentes son lábiles al calor y por lo tanto propensas a desnaturalizarse, la síntesis de proteínas de estrés calórico tiene que ser aumentada, para asistir en la renaturalización de todas esas proteínas, por lo que el control de calidad de las proteínas en éstas circunstancias se vuelve crucial para mantener el metabolismo y viabilidad celulares (Narberhaus, 2002) (Figura 1.5). Del mismo modo, también se ha descrito la participación de las proteínas de estrés

calórico en los procesos de reparación debido a su capacidad de participar en la proteólisis (Polla, 1991).

Así, las proteínas de estrés calórico pueden ser expresadas tanto constitutivamente como en estrés, siendo inducidas en una variedad de condiciones que pueden ser divididas en tres tipos: fisiológicas (ciclo celular, desarrollo, diferenciación celular, etc.); patológicas (infecciones, autoinmunidad, etc.); y medioambientales (estrés calórico, estrés por frío, estrés oxidativo, entre otros (Prohászka y Füst, 2004).

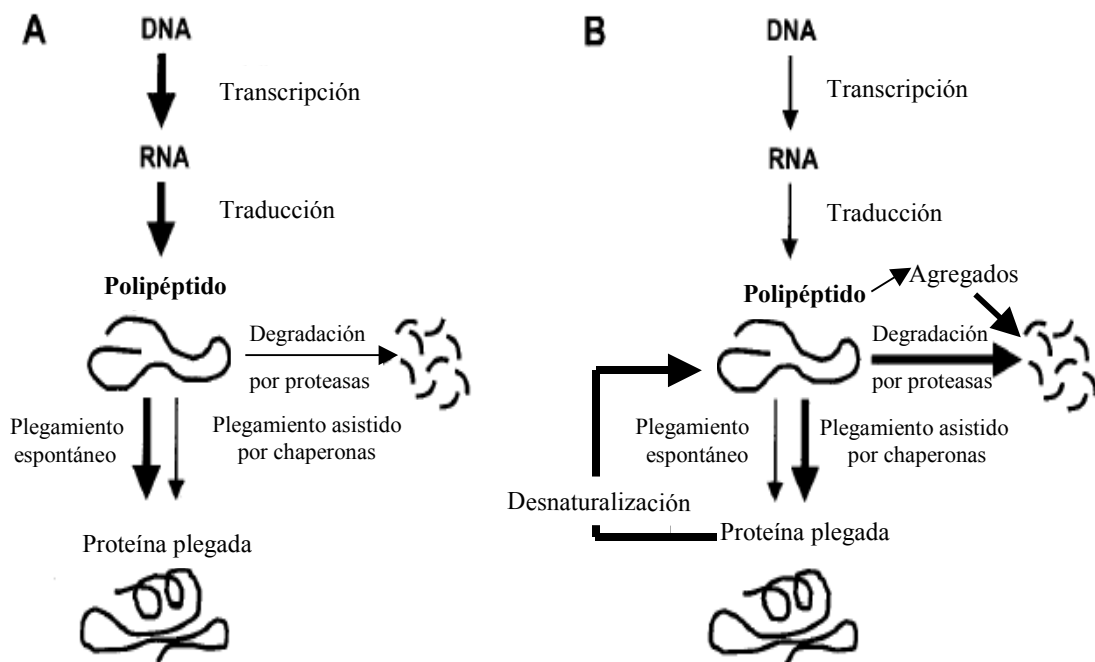


Figura 1.5. Modelo del control de calidad de las proteínas en A) condiciones normales de crecimiento, donde la tasa de transcripción y traducción es alta (líneas gruesas) y la mayoría de las proteínas se pliegan sin la asistencia de chaperonas y B) condiciones de estrés calórico, donde la transcripción y traducción son reducidas (líneas delgadas) y la desnaturalización de proteínas inducida por temperatura regresa al sistema de control de calidad dependiente de chaperonas, donde éstas ahora son las principales responsables de la renaturalización de las proteínas. Aún, algunas proteínas no podrán ser renaturalizadas y serán degradadas en las dos condiciones. Modificado de Narberhaus, 2002.

1.5.1. Familias de proteínas de estrés calórico

A las proteínas de estrés calórico se les ha clasificado de acuerdo con su aparente masa molecular, estimada a través de su corrimiento en geles desnaturizantes de poliacrilamida (Polla, 1991). Sus tamaños pueden ir de 6 a aproximadamente 110 kDa (Maresca y Carratù, 1992). Tradicionalmente, se les ha agrupado en cinco familias principales: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y small-HSPs (sHSPs). Las primeras

cuatro son también conocidas como HSPs de alto peso molecular y las sHSPs como de bajo peso molecular. En bacterias, existen además dos familias adicionales, HSP33 y las charoninas de una sola cadena. A pesar de formar un conjunto de familias de proteínas separadas por características estructurales y de mecanismos de acción, comparten la misma función general de chaperonas moleculares (Narberhaus, 2002).

La actividad de chaperona de las familias de HSPs de pesos moleculares altos requiere de la hidrólisis de ATP, con excepción de HSP90, la cual muestra *in vitro*, actividad de chaperona molecular en una manera independiente de ATP. Adicionalmente, HSP70 y HSP60 requieren de co-chaperonas específicas para llevar a cabo su función. Mientras que HSP70 es un sistema compuesto de tres proteínas: HSP70/HSP40/HSP35, HSP60, también llamada chaperonina, contiene dos miembros: HSP60/HSP10 (Fernandes *et al.*, 2005; Lund *et al.*, 2003; Narberhaus, 2002; Nover y Scharf, 1997). Todas estas familias de proteínas generalmente están presentes tanto en condiciones constitutivas como en condiciones de estrés agudo, donde existe una gran demanda para la renaturalización de proteínas, ayudando a elevar el control de calidad pre-existente asistiendo en el plegamiento, renaturalización, etc. Dependiendo del organismo del que se trate algunas de ellas son indispensables, mientras que en otros son dispensables (Narberhaus, 2002).

Algunos miembros de la familia de HSPs de pesos moleculares bajos están evolutivamente relacionados a la proteína α -cristalino de los vertebrados mientras que otros no lo están, como la Hsp12 y Hsp9 de levadura (de Jong *et al.*, 1998), así como las pertenecientes a las familias HSP33 o HSP10. El α -cristalino es una de las proteínas más abundantes del ojo (cristalino) de los vertebrados, donde tiene un papel estructural, garantizando una refracción y transparencia adecuadas. Existen dos subunidades, α A y α B, cada una codificada por un gen distinto y con una identidad de secuencia de aminoácidos entre ellas de 57%. Mientras que α -A es encontrado principalmente en el cristalino y es muy escaso en otros tejidos, la presencia de α B está más generalizada (Horwitz, 2003). Las proteínas de bajo peso molecular relacionadas con el α -cristalino de los vertebrados son, por lo tanto, conocidas como α -HSPs o α -cristalino-sHSPs (de Jong *et al.*, 1998).

1.5.2. α -HSPs

Las α -HSPs constituyen un grupo de chaperonas moleculares ampliamente distribuidas y pobremente conservadas. Los estudios filogenéticos indican una divergencia muy temprana en la evolución de éste grupo de proteínas (Haslbeck *et al.*, 2005).

Poseen masas moleculares monoméricas pequeñas, las cuales van de 12 a 43 kDa, con la mayoría teniendo una masa de 14-27 kDa. A pesar de estar representadas en los tres dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eukarya), no se han encontrado en todos los organismos (Narberhaus, 2002). En los organismos donde se les ha localizado, el número de genes que las codifican varía de una especie a otra, así como el número de copias, aunque en la mayoría existen como genes únicos (Lee *et al.*, 2000). En plantas se han descrito cinco familias genéticas de estas proteínas, y también hay múltiples genes codificadores de α -HSPs en *Escherichia coli*, *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium etli*, *Toxoplasma gondii*, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, *Artemia*, *Xenopus* y mamíferos, incluido el hombre (de Miguel *et al.*, 2005; MacRae, 2000; Narberhaus, 2002). La mayoría de eucariontes unicelulares tienen usualmente de uno a dos genes que codifican para α -HSPs, entre tanto que es frecuente encontrar un número mayor de genes, a veces considerable, en la mayoría de los eucariontes superiores (Haslbeck *et al.*, 2005). Asimismo, su localización varía entre las distintas especies, mientras que en plantas se encuentran en el citoplasma, cloroplasto, mitocondria, núcleo, peroxisoma y retículo endoplásmico (Basha *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 1996), en animales parecen estar restringidas al núcleo y citosol (Narberhaus, 2002) y la mayoría de los organismos parecen tener sólo una o unas cuantas sHSPs localizadas en el citoplasma (de Miguel *et al.*, 2005).

La similitud de secuencia entre los miembros de este grupo de proteínas es muy baja en comparación con otras familias que han divergido a una tasa mucho menor, como la HSP70 y la HSP90 (Plesofsky-Vig *et al.*, 1992; Waters *et al.*, 1996), por lo que, estrictamente, constituyen una superfamilia, ya que la identidad de secuencia general entre sus miembros es de aproximadamente $\leq 50\%$ (de Jong *et al.*, 1998). A pesar de la gran variación en sus secuencias, poseen 2 ó 3 dominios estructurales (MacRae, 2000) (Figura 1.6A), de los cuales el más conservado tiene de 80-100 residuos de aminoácidos y es conocido como el dominio α -cristalino, determinante del grupo α -HSPs, localizado

en el extremo carboxilo terminal. Precediendo al α -cristalino se encuentra el dominio amino terminal, hidrofóbico y pobremente conservado, variando extremadamente en longitud (24 aminoácidos en *C. elegans* a 246 en *S. cerevisiae*) y secuencia. Sólo pequeñas similitudes se observan en esta región en integrantes distantemente relacionados del grupo de α -HSPs, como la presencia de algunos residuos de prolina (P) y fenilalanina (F) y ninguna secuencia consenso se detecta en todos o en la mayoría de los miembros de la superfamilia, sino sólo en grupos de organismos relacionados como plantas, animales, etc. (de Jong *et al.*, 1998). Adyacente al dominio α -cristalino se encuentra frecuentemente una extensión flexible carboxilo terminal, de longitud (generalmente corta) y secuencia variable (MacRae, 2000), estando prácticamente ausente en algunos organismos con 1-2 residuos de aminoácidos en *C. elegans* y *Methanococcus jannaschii* (Figura 1.6B), hasta 49 residuos en α -HSPs de *Artemia* y *Drosophila* (de Jong *et al.*, 1998; Haslbeck, 2002).

A pesar de la baja similitud presente en las secuencias de α -HSPs, existen algunas regiones altamente conservadas en el dominio α -cristalino, por lo que se ha podido determinar la presencia de motivos característicos de toda la superfamilia, y algunos más característicos de grupos de organismos emparentados, así como también un motivo conservado en la extensión carboxilo terminal (de Jong *et al.*, 1998). Así por ejemplo, la secuencia poco conservada del extremo C-terminal posee en la mayoría de las proteínas, sin importar la longitud, el motivo conservado Isoleucina-X-Isoleucina (I-X-I) o más generalmente Isoleucina/Valina-X-Isoleucina/Valina (I/V-X-I/V) (de Jong *et al.*, 1998; Studer *et al.*, 2002).

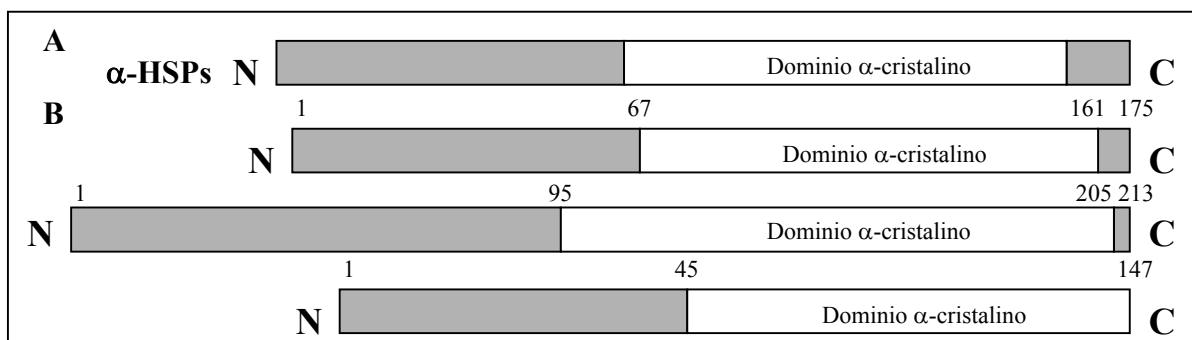


Figura 1.6. Comparación esquemática de los dominios estructurales de α -HSPs. A) Estructura general de la superfamilia. B) Estructura de α -HSPs de distintas especies, reflejando la variabilidad en longitud de los extremos amino y carboxilo terminal, señalados como N- y C-, respectivamente. De arriba hacia abajo, la primera proteína es α B-cristalino de humano, la segunda es Hsp26 de levadura y la última Hsp16.5 de *M. jannaschii*. Los números indican los aminoácidos delimitantes de cada dominio. Modificado de Haslbeck, 2002.

Una de las características distintivas de la gran mayoría de los miembros del grupo de α -HSPs es su capacidad para organizarse en grandes estructuras multiméricas u oligómeros, los cuales pueden tener de 9 a ~50 subunidades, alcanzando una masa de 800 kDa o más (Haslbeck, 2002; MacRae, 2000). Las únicas excepciones conocidas son tres HSPs de *C. elegans*, las cuales forman únicamente tetrámeros y un monómero (Nakamoto y Vígh, 2007). Hasta el momento, la estructura de sólo cinco miembros de la superfamilia han sido determinados, ya sea por cristalografía de rayos X o bien por microscopía electrónica, mostrando una variabilidad estructural y la capacidad de adquirir o intercambiar subunidades, sugiriendo una estructura cuaternaria muy dinámica (Haslbeck *et al.*, 2005). A pesar de la diversidad en la estructura primaria, la estructura secundaria de las α -HSPs es conservada, siendo rica en hojas β -plegadas en el dominio α -cristalino (de Jong *et al.*, 1998). Lo anterior se refleja en la estructura cuaternaria de las proteínas, pues independientemente de el número de subunidades utilizadas en la construcción del oligómero o el arreglo espacial de éste, el dominio α -cristalino forma una estructura β -sandwich compacta conservada compuesta de dos hojas beta antiparalelas y que además posee la capacidad de dimerizarse. Éste dímero representa el bloque de construcción de los oligómeros y la unidad intercambiable más pequeña de muchas α -HSPs (Haslbeck, 2002).

En condiciones fisiológicas, la abundancia de α -HSPs varía dependiendo del organismo estudiado, así como del tipo de célula particular (en el caso de los sistemas multicelulares) o del compartimiento subcelular específico. No obstante, en condiciones de estrés la inducción de este grupo de proteínas puede ser considerable en muchos organismos, constituyendo una de las familias de HSPs que se induce más fuertemente (Haslbeck, 2002; Narberhaus, 2002). Las α -HSPs poseen un papel fundamental en la defensa del organismo durante condiciones de estrés fisiológico, protegiendo a las proteínas no nativa de la agregación irreversible, con las cuales forman complejos muy estables a través de un proceso independiente de energía (Sun y MacRae, 2005). En algunos organismos las α -HSPs no se inducen en condiciones de estrés, sino que la expresión de estas proteínas está regulada por el estado de desarrollo, ciclo celular o diferenciación en el que se encuentren los organismos y se expresan en estados de desarrollo específicos (de Jong *et al.*, 1998; de Miguel *et al.*, 2005; Haslbeck, 2002). Ciertas α -HSPs son claramente indispensables, como SEC-1 en *C. elegans* y Efl en *Drosophila*, donde son esenciales para el desarrollo normal del embrión. En otros

organismos por lo general, la delección de estas proteínas no parece tener algún efecto adverso aparente y son dispensables (de Jong *et al.*, 1998; Narberhaus, 2002).

El mecanismo por el cual las α -HSPs se unen a proteínas desnaturalizadas o no nativas muy probablemente esté basado en interacciones hidrofóbicas, pues muchas α -HSPs experimentan un cambio en el perfil de hidrofobicidad tras un estrés calórico y exponen residuos hidrofóbicos a la superficie, los cuales se tornan disponibles para la unión de las proteínas blanco (MacRae, 2000). En cuanto a la preferencia por el sustrato, estas proteínas parecen ser más bien promiscuas, pues pueden unirse a una amplia variedad de proteínas, con intervalos de masa de 4 a 100 kDa. Asimismo, las α -HSPs representan el grupo de chaperonas con la más alta eficiencia por la unión al sustrato, pues la mayoría de los reportes indican una capacidad de unión de una molécula de proteína desnaturalizada por subunidad o dímero de oligómeros de α -HSPs (Haslbeck, 2002). Las α -HSPs tienden en general, a no interactuar con proteínas nativas, así como tampoco con proteínas completamente desplegadas. La función de α -HSPs es la de unirse a proteínas desnaturalizadas y mantenerlas en un estado competente de plegamiento, las cuales, tras desaparecer la condición de estrés, son liberadas ya sea espontáneamente, o por la acción de sistemas de chaperonas dependientes de energía como HSP60, HSP70 y HSP100, las cuales también las renaturalizan, conformando por lo tanto, una red multichaperona (Figura 1.7) (Nakamoto y Vígh, 2007; Sun y MacRae, 2005). Respecto al mecanismo de activación de las α -HSPs se han propuesto dos modelos, el primero parece estar regulado por la disociación de los oligómeros y el otro en el rearreglo de éstos, en una manera dependiente de temperatura. En el primer modelo, en condiciones normales las α -HSPs existen como oligómeros inactivos, tras un estrés calórico, los oligómeros se disocian en dímeros activos, los cuales son ahora capaces de unirse a las proteínas desnaturalizadas. En el segundo modelo, en condiciones normales las α -HSPs se encuentran en forma de oligómeros inactivos, después de un estrés calórico, dichos oligómeros sufren cambios conformacionales que provocan que éstos pasen de un estado de baja afinidad por el sustrato (condiciones normales) a un estado de alta afinidad (estrés calórico) o activo, con la capacidad de unirse a las proteínas desnaturalizadas (Figura 1.7) (Nakamoto y Vígh, 2007).

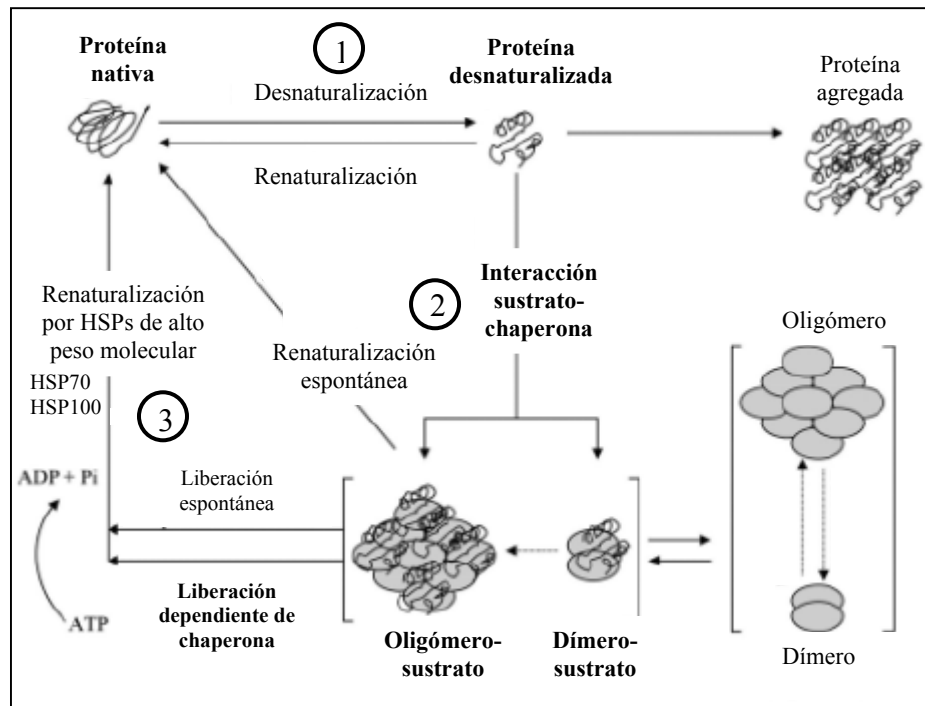


Figura 1.7. Función de α -HSPs. Tras un estrés calórico, las proteínas desnaturalizadas generadas (1) pueden unirse ya sea a los oligómeros re-arreglados o a los dímeros resultantes de la disociación de los oligómeros dependiente de temperatura (2), cuya presencia depende del equilibrio dinámico en el que se encuentran. Al desaparecer el estrés, las proteínas desnaturalizadas unidas a las α -HSPs en complejos muy estables, son liberadas y renaturalizadas, ya sea espontáneamente o con la ayuda de sistemas de chaperonas dependientes de ATP como HSP70 o HSP100 (3). Modificado de Sun y MacRae, 2005.

Finalmente, las α -HSPs parecen estar involucradas en un gran número de otras actividades celulares, entre las que se encuentran: resistencia a apoptosis; modulación del citoesqueleto; enfermedades humanas; procesos de desarrollo en animales, plantas y bacterias; protección contra diversos tipos de estrés; patogenicidad microbiana; protección del aparato fotosintético en plantas; interacciones simbióticas planta-microorganismo; esporulación; inmunogenicidad; entre otras. Aunque muchos de estos procesos implican la actividad de chaperona molecular de las α -HSPs, otros no, por lo que se ha sugerido que la función de este grupo de moléculas no se limite exclusivamente a la protección de otras proteínas (Ferrer *et al.*, 2005; Narberhaus, 2002).

II. ANTECEDENTES

2.1. Respuesta al estrés calórico en distintos organismos

En distintos organismos, desde bacterias a animales, se ha determinado que el estrés calórico induce la síntesis de un conjunto de proteínas con funciones diversas. Sin embargo, existen proteínas comunes a la gran mayoría de los organismos estudiados que son moduladas como respuesta al estrés calórico. Éstas pueden ser agrupadas de acuerdo a su función. Aquéllas encontradas a ser invariablemente inducidas en análisis proteómicos globales comprenden chaperonas moleculares, enzimas productoras de energía y proteínas involucradas en la traducción (Lee *et al.*, 2006; Mádi *et al.*, 2003; Majoul *et al.*, 2004; Schmid *et al.*, 2005; Slabas *et al.*, 2006). Otros genes y proteínas inducidos en estrés calórico comunes a la gran mayoría de los organismos estudiados, incluidos organismos modelo como *E. coli*, *S. cerevisiae* y *Drosophila*, abarcan genes o proteínas de transporte, de biosíntesis de aminoácidos, de transducción de señales, de resistencia a estrés oxidativo, de proteólisis (vía el proteosoma), de metabolismo de ácidos nucleicos (reparación, recombinación), así como reguladores transcripcionales (Causton *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006; Mádi *et al.*, 2003; Majoul *et al.*, 2004; Petersohn *et al.*, 2001; Richmond *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2005; Slabas *et al.*, 2006; Sørensen *et al.*, 2005).

2.2. Respuesta al estrés calórico en *T. cruzi*

En *T. cruzi*, la respuesta al estrés calórico ha sido en general poco estudiada. Sólo algunos trabajos han descrito la inducción de grupos de proteínas en condiciones de estrés calórico en geles unidimensionales (de Carvalho *et al.*, 1990; de Carvalho *et al.*, 1994), mientras que en otros trabajos se ha determinado únicamente la expresión diferencial de proteínas particulares pertenecientes a las familias de HSPs (Fernandes *et al.*, 2005; Graefe *et al.*, 2002; Maresca y Carratù, 1992; Martin *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1994). Alcina *et al.* en 1988 y por otra parte, Requena *et al.* en 1992, determinaron la expresión diferencial de proteínas en geles de doble dimensión al término de un estrés calórico, sin establecer la identidad de ninguna de éstas, siendo los únicos reportes al respecto.

2.3. Familias de proteínas de estrés calórico en *T. cruzi*

Se ha determinado la presencia de distintas HSPs de pesos moleculares altos en especies de parásitos de diferentes géneros: *Brugia*, *Giardia*, *Leishmania*, *Onchocerca*, *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Taenia*, *Trypanosoma*, entre otros (Maresca y Carratù, 1992; Vargas-Parada *et al.*, 2001). En el caso de *T. cruzi*, se han caracterizado los genes que codifican para proteínas de estrés calórico de pesos moleculares altos, entre las que se encuentran las familias HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90, determinando también su participación en la adaptación al estrés calórico y otras condiciones de crecimiento (Dragon *et al.*, 1987; Fernandes *et al.*, 2005; Giambiagi-de Marval *et al.*, 1993; Giambiagi-de Marval *et al.*, 1996; Graefe *et al.*, 2002; Maresca y Carratù, 1992; Martin *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1994; Requena *et al.*, 1988; Requena *et al.*, 1992; Tibbetts *et al.*, 1998).

En cuanto a sHSPs, los géneros de parásitos estudiados pertenecen principalmente al grupo de platelmintos y nemátodos (Ferrer *et al.*, 2005), y también se les ha encontrado en *Toxoplasma* y *Entamoeba* (Caballero-Franco, 2002; de Miguel *et al.*, 2005).

Dentro del grupo de los tripanosomátidos, sólo en *Leishmania* se ha detectado la sobreexpresión de algunas sHSPs (Alcina y Fresno, 1988; Lawrence y Robert-Gero, 1985), sin ninguna información sobre su secuencia. Es importante mencionar que en *T. cruzi* no se ha reportado antes la presencia de alguna sHSPs.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La respuesta al estrés calórico ha sido estudiada extensivamente en organismos que tienen una sola temperatura óptima de crecimiento, sin embargo, existe mucho menos información sobre dicha respuesta en organismos digenéticos, como sería *T. cruzi*. El estudio de la respuesta al estrés calórico en parásitos protozoarios que tienen dos temperaturas óptimas de crecimiento durante su ciclo de vida es de interés debido al papel potencial que distintas proteínas puedan tener en la adaptación al hospedero mamífero. De esta manera, el estrés calórico, usado además como modelo para determinar el impacto del estrés ambiental en los sistemas biológicos, puede revelar en *T. cruzi*, proteínas del parásito involucradas en la adaptación a condiciones fluctuantes del ambiente, las cuales podrían ser importantes para su sobrevivencia.

Por otro lado, hasta el momento, ninguna proteína de estrés calórico de bajo peso molecular ha sido identificada en el genoma de *T. cruzi*, no obstante, debido a que se ha reportado la existencia de esta clase de moléculas en parásitos relacionados, así como su papel en distintos procesos biológicos, será importante determinar la presencia de sHSPs en *T. cruzi*.

Asimismo, las aproximaciones anteriores permitirán ampliar el conocimiento de la biología del parásito.

IV. HIPÓTESIS

Si *Trypanosoma cruzi* es expuesto a condiciones de estrés calórico, entonces éste mostrará una expresión diferencial de diversas proteínas.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- ❖ Estudiar la respuesta de estrés calórico en *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos particulares

- ❖ Analizar el perfil proteómico de *T. cruzi* en condiciones de estrés calórico.
- ❖ Determinar la identidad de proteínas resueltas en el análisis proteómico.
- ❖ Identificar una proteína de estrés calórico de bajo peso molecular en *T. cruzi*.
- ❖ Caracterizar la proteína de estrés calórico de bajo peso molecular identificada en el parásito.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas y plásmidos utilizados

Las cepas de *T. cruzi* y de *E. coli*, así como los plásmidos utilizados en el presente trabajo se enlistan en la tabla 6.1 y 6.2, respectivamente.

Tabla 6.1. Cepas de *T. cruzi* y de *E. coli* empleadas

Cepa	Características relevantes	Referencias
<i>T. cruzi</i>	Grupo genético	Virulencia
Ninoa 2003	I	Avirulenta
Querétaro 2003	I	Virulenta
Ver-6	II	ND
<i>E. coli</i>	Genotipo	
TOP10	F ⁻ <i>mcrA recA1 galU galK</i> (Str ^r)	Invitrogen (TA Cloning Kit)
XL1-Blue	F ['] <i>recA endA1 lac Tn10</i> (Tet ^r)	Stratagene
BL21Star (DE3)	F ['] <i>ompT gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen

ND: No determinada

Tabla 6.2. Lista de plásmidos empleados

Plásmido	Características relevantes	Referencias
pCR2.1	LacZ α M13-R T7 Promoter (Km ^r)	Invitrogen
pET23a	T7 Promoter His-Tag C- (Amp ^r)	Novagen
pCR2.1/sHSP-N	ORF <i>sHSP16</i> cepa Ninoa clonado en pCR2.1	Este trabajo
pCR2.1/sHSP-Q	ORF <i>sHSP16</i> cepa Qro. clonado en pCR2.1	Este trabajo
pCR2.1/sHSP-V	ORF <i>sHSP16</i> cepa Ver6 clonado en pCR2.1	Este trabajo
pET23a/sHSPTc	ORF <i>sHSP16</i> cepa Qro. clonado en pET23a	Este trabajo

6.2. Condiciones de cultivo

6.2.1. *T. cruzi*

Epimastigotes de las cepas Ninoa, Querétaro y Ver-6 de *T. cruzi* fueron mantenidos rutinariamente a 28°C en medio de infusión de hígado (LIT) (Anexo 1).

6.2.2. *E. coli*

Las cepas de *E. coli* fueron incubadas rutinariamente en medio Luria-Bertani (LB) sólido o líquido (Anexo 1) a 37°C. Cuando fue necesario, el medio de cultivo se suplementó con los antibióticos correspondientes, dependiendo de los plásmidos que se utilizaron para transformar a las cepas (Anexo 1).

6.3. Análisis proteómico

La electroforesis bidimensional (2D-PAGE) permite separar un gran número de proteínas en un solo experimento, teniendo una alta resolución debido al acoplamiento de las dos estrategias de separación que la constituyen. La separación de la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque, durante el cual las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero. En una segunda dimensión, las proteínas son separadas mediante electroforesis en presencia de SDS (Görg *et al.*, 1988).

6.3.1. Ensayo de estrés calórico

Se realizó con parásitos creciendo exponencialmente, cuyo número fue determinado utilizando un hemocitómetro (Sambrook, 1989). Los cultivos se iniciaban con una concentración de 3×10^6 cels/ml en un volumen final de 10 ml de medio LIT fresco en cajas de cultivo de 25 cm². Transcurridos tres días de incubación a 28°C, los cuales correspondían a la fase exponencial de crecimiento y en los que el cultivo había alcanzado una densidad de 25×10^6 cels/ml \pm 5×10^6 cels/ml, se dividía al cultivo en dos partes iguales, de tal forma que 5 ml de éste cultivo siguieron siendo mantenidos a 28°C para ser usados como control y los otros 5 ml fueron sometidos a un cambio brusco en la temperatura, mediante su incubación a 42°C durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de incubación en cada condición, los cultivos se centrifugaban a 3000 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechaba y el botón de parásitos se resuspendía en 1 ml de PBS 1X. Se centrifugaba nuevamente en las mismas condiciones, se desechaba el sobrenadante y se determinaba el peso húmedo del botón de células con el fin de proceder a realizar la extracción de proteínas.

6.3.2. Extracción total de proteínas

El botón de parásitos se resuspendía en amortiguador de lisis (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, trizma base 0.0008 g/ml) con inhibidores de proteasas (EDTA 12 mM, PMSF 1 mM, pepstatin 0.001 mM y leupeptin 0.1 mM) en una relación de 3 ml de amortiguador de lisis/gramo de peso húmedo. Se agitaba vigorosamente durante 3 minutos e incubaba en hielo por 10 minutos. Posteriormente se centrifugaba a 12 800 x g durante 15 minutos y finalmente se recuperaba el sobrenadante, el cual era el extracto

proteico. Los extractos se congelaban a -70°C hasta su uso y su integridad se evaluaba mediante su separación en geles de poliacrilamida al 12%.

6.3.3. Cuantificación de proteínas

Se llevó a cabo utilizando el kit comercial “2D-Quant Kit” (Amersham Biosciences). Brevemente, se prepara una curva estándar con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovina (BSA) y volúmenes establecidos de las muestras a determinar. Después de la precipitación y sedimentación de las proteínas, éstas reaccionan con el reactivo de trabajo y se lee su absorbancia a 480 nm. Con los valores obtenidos para la BSA se construye una gráfica y las concentraciones de las muestras problema se obtienen al interpolar los valores de la densidad óptica derivados de éstas.

6.3.4. Rehidratación de tiras IPG

Se utilizaron las tiras “ReadyStrip IPG Strip” de 17 cm y pH 3-10 NL (Bio-Rad). Se preparó el amortiguador de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, trazas de azul de bromofenol). Al volumen de muestra donde tenía 300 μg de proteína se ajustaron las concentraciones de urea, tiourea y CHAPS anteriores y añadió 2% de amortiguador IPG (pH 3-10) (Bio-Rad) y 6.02 μl de una solución stock de DTT (0.01 g/75.3 μl H₂O milli Q). Finalmente, se aforó a 300 μl con el amortiguador de rehidratación conteniendo la muestra de interés y dicho volumen se aplicó sobre una tira colocada en una charola de rehidratación. El gel de la tira absorbía el volumen aplicado (30-45 minutos) y después se cubría con aceite mineral para evitar su evaporación. Se dejaba rehidratando por un mínimo de 12 horas a temperatura ambiente (Berkelman y Stenstedt, 1998).

6.3.5. Isoelectroenfoque (IEF)

Transcurrido el tiempo de rehidratación, las tiras se colocaron en un PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) para su IEF, con el cual se lograba la separación de la mezcla de proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico. Las condiciones para el IEF, recomendadas por el proveedor (Bio-Rad) fueron las siguientes:

Paso	Voltaje final	Tiempo	Modo	Temperatura
1	250 V	20 min	Lineal	20°C
2	10 000 V	2.5 hrs	Lineal	20° C
3	40 000 V/Hr	(~6-8 hrs)	Rápido	20° C

6.3.6. Equilibrio de tiras

Se preparaban 20 ml de amortiguador de equilibrio (Tris-HCl pH 8.8 0.05 M, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, trazas de azul de bromofenol) y se adicionaba a una parte del amortiguador, DTT (0.1 g/10 ml) y a la otra, iodoacetamida (0.25 g/10 ml) e incubaban las tiras durante 15 minutos en cada solución con el fin de saturarlas de los reactivos necesarios para su separación por peso molecular en la segunda dimensión (Berkelman y Stenstedt, 1998).

6.3.7. Electroforesis de proteínas (segunda dimensión)

La separación por masa molecular se realizó en un gel de poliacrilamida al 10% de 18x18 cm y grosor 1.5 mm (Anexo 3) mediante electroforesis bidimensional en presencia de SDS (2D-PAGE). Las tiras equilibradas se colocaron arriba del gel y se fijaron con una solución de agarosa al 0.5% (Anexo 3). Cada gel se corrió en una cámara de electroforesis PROTEAN II XL (Bio-Rad) con 2.5 L de amortiguador de electroforesis 1X (Anexo 3) durante 30 minutos a 16mA y por aproximadamente 8 horas a 24 mA, o hasta que el frente del corrimiento alcanzaba el borde del gel.

6.3.8. Tinción con nitrato de plata

Las proteínas fueron rutinariamente visualizadas mediante su tinción con nitrato de plata, siguiendo el siguiente protocolo (Paba *et al.*, 2004): fijar durante 12 horas en una solución de metanol al 50% y etanol al 10%; incubar durante 1 hora en metanol al 5% y etanol al 1%; lavar 3 veces en agua milli Q durante 5 minutos; incubar en tiosulfato de sodio (0.02%) durante 90 segundos (agitar); lavar en agua milli Q 3 veces por 30 segundos; teñir en un recipiente de vidrio con nitrato de plata (0.2%) por 40 minutos; lavar en agua milli Q 3 veces por 60 segundos; revelar con solución reveladora (carbonato de sodio 6%, formaldehído 0.05%, tiosulfato de sodio 0.002%) por un máximo de 10 minutos; agregar a la solución anterior ácido acético al 6% para

detener la reacción (agitar hasta quitar las burbujas); lavar con agua milli Q varias veces.

6.3.9. Captura y análisis de imágenes

La captura de las imágenes de los geles se llevó a cabo inmediatamente después de terminar el proceso de tinción con nitrato de plata en un Fluor-S MultiImager (Bio-Rad).

El análisis de los geles se realizó con el programa para análisis de geles de doble dimensión PDQuest (Bio-Rad). Una vez eliminado el ruido de fondo, el reporte de detección de los puntos en el gel (proteínas) se obtiene en unidades de densidad óptica (OD), la cual se calcula al dividir la intensidad de luz incidente entre la intensidad de luz transmitida y tomando el log (base 10) del cociente obtenido. A cada pixel se le asigna un valor de OD y la interpolación lineal de cada OD es usada para expresar la cuantificación. El análisis de las imágenes de los geles se realizó con el parámetro de grupos por replicado, con el cual se obtiene el valor de densidad promedio de los geles repetidos independientes.

6.3.10. Tinción con plata compatible con espectrometría de masas

Una vez determinadas las proteínas de interés para su identificación por huella peptídica, se realizó el corrimiento bi-dimensional de un extracto proteico fresco de *T. cruzi* cepa Ninoa para su tinción con plata compatible con espectrometría de masas utilizando el kit comercial “Silver SNAP Stain for Mass Spectrometry” (Pierce). En breve, este kit permite la tinción de proteínas con plata ultra sensible y una eficiente destinción de las piezas cortadas del gel que es compatible con los análisis de espectrometría de masas. Después de fijar a las proteínas en el gel, éstas son sensibilizadas para su posterior tinción y una vez teñidas apropiadamente, la reacción es detenida. Tras la tinción, cada proteína previamente seleccionada fue extraída manualmente del gel con una micropunta y posteriormente desteñida siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.3.11. Identificación de proteínas mediante huella peptídica (PMF)

El análisis de espectrometría de masas (MS) se realizó en el Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud

Pública, Cuernavaca, México dirigido por el Dr. Humberto Lanz, por el Q. Gerardo Hurtado. Brevemente, las proteínas fueron sujetas a una digestión en-gel con tripsina (20 ng/μl) a 37°C durante toda la noche. Después de un tratamiento de lavado con bicarbonato de amonio, los péptidos fueron extraídos con ácido fórmico y CH₂CN y concentrados al vacío. Los péptidos generados se incorporaron en un placa metálica usando ácido α-cyano-4-hydroxycinnamico como matriz. Las mezclas de péptidos fueron entonces ionizadas en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF (Voyager DE-PRO USA) equipado con un láser de nitrógeno a 337 nm.

6.3.12. Búsqueda en la base de datos

Las proteínas digeridas y procesadas por MALDI-TOF dieron un conjunto de iones/masa (m/z) o huella peptídica que se analizaron en las bases de datos Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>) y MS-Fit en UniProt.2006.03.21 (<http://www.pir.uniprot.org>) con modificación de carboxiamidometilación de los residuos de cisteína y dirigido a la especie *Trypanosoma cruzi*.

6.4. Análisis molecular

El análisis molecular consistió en la determinación de la secuencia y caracterización parcial del gen *SHSP16* de *T. cruzi*.

6.4.1. Análisis de secuencias

La búsqueda en la base de datos preliminar del genoma de *T. cruzi* se realizó en la versión disponible para el día 4 de Abril de 2005 vía <http://TcruziDB.org>, utilizando el algoritmo blastx. Para la comparación de secuencias se utilizaron los algoritmos blastp y blastx de la base de datos del GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). El programa ORF Finder (Open Reading Frame Finder) (NCBI) se usó para encontrar marcos de lectura abiertos putativos. La búsqueda de dominios conservados se ejecutó con el programa CD-Search (Conserved Domain Search) (NCBI) (Marchler-Bauer y Bryant, 2004). El programa BioEdit Versión 5.0.6 (CLUSTALW) se utilizó para el análisis y alineamiento múltiple de secuencias. La predicción de estructura secundaria se realizó con los programas PROF-Secondary Structure Prediction System (Ovali y

King, 2000); Predict Secondary Structure (PSIPRED) (Jones, 1999; McGuffin *et al.*, 2000); y Protein Families Database (PFAM) (Bateman *et al.*, 2000).

6.4.2. Modelamiento molecular

La construcción del modelo 3D de la estructura de SHSP16 de *T. cruzi* se realizó con el programa Swiss-Model (Guex y Peitsch, 1997) y se analizó y comparó con otros modelos de SHSPs con el Swiss-PDB Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv>) (Guex y Peitsch, 1997). El modelo de la proteína se editó con los programas PPG: the Protein Picture Generator (<http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/PPG>) y con DINO: Visualizing Structural Biology (2002) (<http://www.dino3d.org>).

6.4.3. Extracción de DNA total de *T. cruzi*

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Macedo *et al.*, 1992, con modificaciones de Sambrook, 1989. Resuspender los parásitos en 2 ml de amortiguador de lisis (NaCl 0.08 M, EDTA pH 8.0 0.045 M, SDS 1%). Fraccionar en dos partes iguales el lisado celular y agitar vigorosamente durante 30 segundos. Adicionar a cada tubo 5 µl de la solución stock de Proteinasa K (20 mg/ml). Agitar suavemente por inversión. Incubar toda la noche a 37°C. Adicionar 1 volumen de fenol saturado. Mezclar suavemente por inversión hasta obtener una emulsión. Centrifugar 10 minutos a 12 800 x g. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio. Adicionar un volumen igual de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar suavemente por inversión hasta obtener una emulsión. Centrifugar 10 minutos a 12 800 x g. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio libre de DNAsas y RNAsas. Adicionar 2 volúmenes de etanol frío y agitar suavemente por inversión durante 30 segundos con el fin de precipitar el DNA. Colocar el tubo a -20°C durante 1 hora. Centrifugar 12 minutos a 12 800 x g a 4°C. Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no llevarse el botón de DNA. Adicionar 400 µl de etanol al 70%. Centrifugar 12 minutos a 12 800 x g a 4°C. Eliminar el sobrenadante teniendo cuidado de no llevarse el botón de DNA. Dejar evaporar el líquido remanente a temperatura ambiente. Disolver el botón de DNA en 500 µl de amortiguador de Rnasa (NaCl 0.08 M, EDTA pH 8.0 0.05 M, ribonucleasa A 50 µg/ml). Incubar a 37°C durante 1 hora. Repetir los pasos 6-19. Disolver el botón de DNA en 200 µl de agua milli Q estéril.

La integridad y cantidad del DNA fue determinada por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Anexo 4) teñido con bromuro de etidio, así como espectrofotométricamente (Gene Quant pro, Amerham Pharmacia Biotech).

6.4.4. Extracción de RNA total de *T. cruzi*

El RNA total de epimastigotes de *T. cruzi* en la fase exponencial de crecimiento fue extraído utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Agregar 1 ml de TRIzol al botón de parásitos ($20\text{-}30 \times 10^6$ cels/ml) cosechados en un tubo limpio libre de DNAsas y RNAsas. Resuspender el botón por agitación e incubar 10 minutos en hielo. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionar 200 μ l de cloroformo por ml de TRIzol empleado. Mezclar por inversión. Incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12 000 x g durante 15 minutos a 4°C. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio libre de DNAsas y RNAsas. Adicionar 500 μ l de alcohol isoamílico por ml de TRIzol empleado. Mezclar por inversión. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 12 000 x g durante 10 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 75%. Centrifugar a 7 500 x g durante 5 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante. Dejar evaporar el líquido remanente a temperatura ambiente. Disolver el RNA en 50 μ l de la solución H₂O-DEPC (DEPC 0.1%).

La integridad y cantidad del RNA fue determinada por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, así como espectrofotométricamente (Gene Quant pro, Amerham Pharmacia Biotech).

6.4.5. Amplificación del gen SHSP16

El gen *SHSP16* fue amplificado a partir de DNA genómico de las tres cepas mexicanas de *T. cruzi* con el par de oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia nucleotídica completa identificada y cuyas secuencias son las siguientes: sHSP16-F (5'-AGATCTCATATGTGGGATCCGTTTCGCGATGTGG-3') y sHSP16-R (5'-CTCGAGAGATCTATTGATCTTCACGGAGATCCCC-3'). En sHSP16-F se incluyó el sitio de corte para la enzima de restricción NdeI y en sHSP16-R el sitio de restricción para XhoI, subrayados en las secuencias, con fines prácticos de clonación.

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 50 μ l conteniendo cada una 200 ng de DNA, 1.2 μ M de cada primer, 0.2 mM de cada dNTP,

1.5 mM de MgCl₂, amortiguador de PCR 1X y 2.5 U de DNA polimerasa Taq Platinum (Invitrogen Life Technologies). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 3 minutos a 95°C; 30 ciclos de 3 minutos a 95°C y 1.5 minutos a 60°C; y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR obtenidos de 450 pb se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% (Anexo 4) y se tiñeron con bromuro de etidio.

6.4.6. Clonación de SHSP16 en el vector pCR2.1

Los amplificadores resultantes para cada una de las tres cepas se clonaron en el vector pCR2.1 del “TA Cloning Kit” (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 5 µl, conteniendo cada una 2 µl de cada producto de PCR fresco (~2.5 µg), 1 µl del vector pCR2.1 (25 ng/µl), 0.5 µl de T4 DNA ligasa (4 unidades Weiss/µl), 0.5 µl de amortiguador de ligación 10X y 1 µl de H₂O. Se incubaron a 14°C durante toda la noche.

6.4.7. Transformación de pCR2.1 en células de *E. coli*

Las reacciones de ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* TOP10 del “TA Cloning Kit” (Invitrogen Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante: Descongelar las células quimio-competentes de *E. coli* en hielo. Añadir 2.5 µl de la reacción de ligación a las células competentes y dejar incubando en hielo por 30 minutos. Incubar las células a 42° C por 30 segundos exactos, pasarlas inmediatamente a hielo (choque térmico), y dejar enfriar por 2 minutos adicionales. Transferir las células competentes a un tubo eppendorf conteniendo 1 ml de medio LB y dejar incubando a 37° C en agitación durante 1 hora. Centrifugar las células y tirar la mayor parte del sobrenadante, dejando solamente 50 µl, volumen en el que se resuspende la pastilla de células. Plaquear las células en cajas de LB con el antibiótico adecuado, según el plásmido utilizado, en éste caso Km (Anexo 1). Seleccionar únicamente las clonas blancas (positivas) para su análisis posterior.

6.4.8. Extracción de DNA plasmídico

El DNA plasmídico de las clonas positivas se extrajo con el kit comercial “QIAprep Spin Miniprep Kit” (QIAGEN). Brevemente, el principio del kit se basa en la lisis alcalina de las bacterias, seguido por la adsorción selectiva de DNA plasmídico

sobre una membrana de sílica-gel en la presencia de una alta concentración de sales. El DNA plasmídico es finalmente eluido con un amortiguador bajo en sales o agua.

6.4.9. Digestión del vector pCR2.1

Para determinar la presencia del inserto, los plásmidos extraídos fueron digeridos con la enzima de restricción EcoRI, pues en el vector, dos sitios de restricción para dicha enzima flanquean al sitio de clonación del inserto. Las digestiones se llevaron a cabo en una reacción de 20 µl conteniendo cada una 2 µl del plásmido extraído, 10 U de EcoRI (Invitrogen), 2 µl de amortiguador 10X y 15 µl de H₂O. Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Cinco µl de cada reacción de digestión fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio.

Las construcciones resultantes para cada cepa fueron nombradas pCR2.1/sHSP-N, pCR2.1/sHSP-Q y pCR2.1/sHSP-V (ver Tabla 6.2). Una vez que se determinó la presencia del inserto, los plásmidos correspondientes para cada cepa de *T. cruzi* fueron mandados a secuenciar en ambas direcciones con primers universales (T7 Promoter y M13 Reverse).

6.4.10. RT-PCR semicuantitativo

Con el fin de analizar la expresión del mRNA de *SHSPI6* durante condiciones de estrés calórico, un número igual de epimastigotes de *T. cruzi* en la fase exponencial de crecimiento (25×10^6 cels/ml \pm 5×10^6 cels/ml) procedentes del mismo cultivo fueron mantenidos durante 3 horas a distintas temperaturas: 28°C para la condición control y 37, 39 o 42°C para la condición de estrés calórico. A cada uno de los cultivos se les extrajo el RNA total como ya se describió (sección 6.4.4.) y una vez extraído se trató con DNasa I, Amplification Grade (Invitrogen) con el fin de eliminar cualquier contaminación con DNA residual, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones para la preparación de muestras de RNA previo al RT-PCR se llevaron a cabo en un volumen de 10 µl, conteniendo 1 µg de RNA, 1 µl del amortiguador de reacción de Dnasa I 10X, 1 µl de la Dnasa I (1 U/µl) de Invitrogen y el volumen necesario de H₂O-DEPC (ver protocolo 6.4.4.) para tener 10 µl totales. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La inactivación de la Dnasa I

se obtuvo al adicionar 1 μ l de EDTA 25 mM (Invitrogen) e incubando a 65°C durante 10 minutos.

La reacción de Transcriptasa Reversa se llevó a cabo utilizando el Kit TaqMan Reverse Transcription (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada reacción contenía 400 ng de RNA tratado, amortiguador de RT TaqMan 1X, 5.5 mM de MgCl₂, 500 μ M de cada dNTP, 2.5 μ M de hexameros azarosos, 0.4 U/ μ l del inhibidor de RNasa, 1.25 U/ μ l de la transcriptasa reversa MultiScribe y H₂O-DEPC. Los parámetros de la RT fueron los siguientes: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 48°C y 5 minutos a 95°C. De los 400 ng de cDNA obtenidos, 200 ng se utilizaron para la amplificación de *SHSP16* en las condiciones ya descritas (ver sección 6.4.5.) y 200 ng para la del gen control.

Para confirmar el empleo de cantidades iguales del templado de RNA en cada condición (normal y estresada), se realizaron PCRs utilizando primers específicos para la amplificación del gen constitutivo *S4* (subunidad ribosomal), cuyas secuencias son las siguientes: S4GST-F (5'-GGGATCCCCATGACCAAGAAGCACCTG-3') y S4GST-R (5'-GGGATCCTATTTTCGTGCCTTGCG-3') (Pérez-Escobar *et al.*, 2007). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 50 μ l conteniendo cada una 200 ng de cDNA, 1 μ M de cada primer, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, amortiguador de PCR 1X y 2.5 U de DNA polimerasa Taq Platinum (Invitrogen Life Technologies). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 minutos a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C; y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El amplificado obtenido fue de aproximadamente 800 pb.

Los controles negativos son aquéllos a los que se les adicionó agua y no cDNA en cada una de las reacciones y en los que se utilizó el RNA sin “retro-transcribir”. Todos los productos de PCR obtenidos para cada set de primers se resolvieron en el mismo gel de agarosa al 1.5% y se tiñeron con bromuro de etidio. Cada extracción de RNA total y RT-PCR se llevó a cabo por triplicado en experimentos independientes. Los datos densitométricos de las bandas se obtuvieron tras analizar la imagen de cada gel con el programa ImageJ (National Institute of Health, USA).y las bandas de SHSP16 fueron normalizadas con la respectiva banda de S4.

6.4.11. Clonación de SHSP16 en pET23a

La secuencia codificante completa del gen *SHSP16* de *T. cruzi* cepa Qro. clonada en el vector pCR2.1 (pCR2.1/sHSP-Q), fue subclonada en el vector de expresión pET23a (+) (Novagen) como sigue: los dos plásmidos fueron digeridos a 37°C durante toda la noche con 10 U de cada una de las enzimas de restricción NdeI y XhoI (Invitrogen). El fragmento liberado de la construcción pCR2.1/sHSP-Q fue purificado de un gel de agarosa al 1.5% utilizando el “QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit” (QIAGEN), basado en la solubilización eficiente de la agarosa y posterior adsorción selectiva de ácidos nucleicos a las partículas de sílica-gel en la presencia de alta concentración de sales, para su final elución con un amortiguador bajo en sales o agua. El fragmento purificado de 450 pb fue ligado en el vector pET23a en una reacción de 10 µl conteniendo 3 µg del fragmento purificado, 500 ng del vector pET23a linearizado, 1 µl de T4 DNA ligasa (4 unidades Weiss/ µl) (Invitrogen) y 1 µl de amortiguador de ligación 10X. Las reacciones se incubaron a 14°C durante toda la noche y se transformaron en células químicamente competentes de *E. coli* XL1-Blue (Stratagen) siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.4.7. pero utilizando el antibiótico Amp (Anexo 1). Para determinar la presencia del inserto en las clonas positivas, el DNA plasmídico se extrajo como ya se describió (sección 6.4.8.) y se digirió con 15 U de la enzima de restricción EcoNI (NEBiolabs), cuyo sitio de restricción se encuentra únicamente en el inserto y no en el vector. Finalmente, se mandó secuenciar dos veces en una dirección con el primer universal T7 promoter con el fin de corroborar que no hubiera cambios en la secuencia. El inserto fue clonado corriente arriba y en fase con una secuencia que codifica un péptido de fusión C-terminal (6xHis), resultando en la construcción pET23a/sHSPTc.

6.4.12. Sobreexpresión de la proteína recombinante

Para el ensayo de expresión de la proteína recombinante, la construcción pET23a/sHSPTc se transformó (sección 6.4.7) en células de *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen) y se seleccionaron con Amp. Después del crecimiento como colonias aisladas, una sola clona positiva se inoculó en medio LB suplementado con Amp (50 µg/ml) a 37°C durante 12 horas. El cultivo se refrescó para alcanzar una OD₆₀₀ de ~0.1 y se incubó por 2 horas más en la presencia o ausencia de IPTG 0.4 mM. Las células se cosecharon (5 000 x g por 20 minutos a 4°C), y el botón se resuspendió en amortiguador

de unión sin urea (fosfato de sodio 0.02 M, NaCl 0.5 M, imidazol 0.045 M, pH 7.4) en 3 ml de amortiguador/gramo de peso húmedo. Dicho botón se sonicó con 3 pulsos de 15 segundos cada uno y una amplitud de 80 en un Ultrasonic homogenizer (Cole Parmer) con el fin de obtener el extracto proteico. Se adicionaron los inhibidores de proteasas PMSF 1 mM; Pepstatin 0.001 mM; y Leupeptin 0.1 mM. El extracto proteico se centrifugó a 3 500 x g durante 45 minutos a 4°C con el objeto de separar la fase soluble (sobrenadante) e insoluble (botón). El botón se lavó 2 veces con PBS 1X/Tritón X-100 al 2% y finalmente se resuspendió en 1 ml de amortiguador de unión (fosfato de sodio 0.02 M, NaCl 0.5 M, imidazol 0.045 M, urea 8 M pH 7.4). Los controles negativos de la expresión de la proteína fueron las células de *E. coli* BL21 Star (DE3) sin transformar y aquéllas transformadas con el vector pET23a solo (sin inserto).

6.4.13. Purificación de la proteína recombinante

Para la purificación de la proteína en condiciones desnaturalizantes, el botón obtenido a partir de cultivos que expresaron la proteína recombinante fue aplicado a una columna HiTrap Chelating HP, 5 ml (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Lavar la columna con 15 ml de agua bidestilada para desechar el etanol al 20%. Cargar 2.5 ml de sulfato de níquel 0.1 M. Lavar con 15 ml de agua bidestilada. Equilibrar la columna con 50 ml del amortiguador de unión (fosfato de sodio 0.02 M, NaCl 0.5 M, imidazol 0.045 M, urea 8 M pH 7.4). Centrifugar la muestra o filtrarla por una membrana de 0.45 µm inmediatamente antes de aplicarla a la columna. Aplicar la muestra. Un desplazamiento parcial de los iones metálicos quelados es frecuentemente visible cuando la proteína es absorbida. Lavar con 50 ml del amortiguador de unión. Eluir con 20 ml del amortiguador de elución (fosfato de sodio 0.02 M, NaCl 0.5 M, imidazol 0.5 M, urea 8 M pH 7.4). Flujo recomendado: 5 ml/minuto.

Utilizando una membrana de diálisis (Spectra), la proteína eluída se dializó durante 48 horas contra amortiguador de diálisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM NaCl) conteniendo concentraciones decrecientes de urea (8-0 M) para una diálisis gradual. La proteína dializada fue concentrada en un Vacufuge eppendorf y la cuantificación fue determinada por “2-D Quant Kit” (Amersham Biosciences) (sección 6.3.3.).

6.4.14. Electroforesis

Los extractos proteicos fueron separados por SDS-PAGE por el método de Laemmli, 1970 en un gel de poliacrilamida al 15%. Las proteínas se visualizaron mediante la tinción de los geles con azul de Coomasie (Anexo 3). Antes de ser cargadas en los geles, cada muestra fue calentada por 5 minutos a 100°C en amortiguador de muestra 1X (Anexo 3) en presencia o ausencia de 6% de β -mercaptoetanol.

6.4.15. Producción de anticuerpo policlonal anti-SHSP16

Tres cobayos hembra fueron inmunizados con SHSP16. La proteína recombinante purificada (50 μ g) fue mezclada con un volumen igual de adjuvante completo de Freund (Gibco) y dicha emulsión (0.3 ml), fue inyectada subcutáneamente en cada cobayo. Dos inyecciones similares (50 μ g de proteína) fueron aplicadas al día 23 y 40 pero empleando adjuvante incompleto de Freund (Gibco). Los cobayos fueron sacrificados el día 57 y las muestras de suero recolectadas. Las muestras de suero pre-inmunes e inmunes de cada cobayo fueron analizadas por Western blot y en base a los resultados obtenidos, se decidió utilizar el suero del cobayo 2 para los análisis posteriores.

6.4.16. Análisis de Western blot

Para el análisis de Western blot, concentraciones iguales de la proteína recombinante o de los extractos del parásito (según el caso) fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 15%, después de SDS-PAGE, las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un sistema de transferencia semi-seco (Bio-Rad). La transferencia se realizó cubriendo la membrana, el gel y los papeles filtro con 20 ml de amortiguador de transferencia (Anexo 2) a 20 V durante 1 hora. Los sitios de unión no específicos de las membranas fueron bloqueados con leche al 10% en PBS1X durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente en una solución de leche al 10% en PBS1X. Las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos cada vez con PBS1X-Tween20 0.01% y a continuación incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en PBS1X-Tween20 0.01%. Finalmente, las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos cada vez con PBS1X-Tween20 0.01% y

reveladas con el sustrato 3,3- diaminobenzidina (0.5 mg/ml de PBS1X) y 0.02% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

En el caso donde se utilizó el anticuerpo monoclonal Anti-his de ratón (QIAGEN), se disolvieron 1.5 µl de éste en 5 ml de leche al 10%/PBS1X, mientras que el segundo anticuerpo correspondió a IgG anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Zymed) a una dilución 1/1000. Cuando se utilizaron como primer anticuerpo los sueros de cobayo anti-SHSP16, éstos se diluyeron 1/20 y el segundo anticuerpo correspondió a anti-cobayo conjugado con HRP (Zymed). Finalmente, los sueros humanos se diluyeron 1/50 y los anticuerpos secundarios utilizados en éste caso fueron anti-IgG humano acoplado a peroxidasa (Zymed).

La captura de las imágenes de las membranas se llevó a cabo en un Fluor-S MultiImager (Bio-Rad). La cuantificación de las bandas se realizó con el programa ImageJ (National Institute of Health, USA).

6.4.17. Ensayos de actividad de chaperona

La actividad de chaperona de SHSP16 fue evaluada midiendo su capacidad para suprimir la agregación inducida por calor (43°C) de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) mitocondrial de corazón de cerdo (EC 1.1.1.37) obtenida de Sigma. Con el fin de obtener la absorbancia óptima que permitiera seguir el proceso de agregación de la MDH a 43°C, la concentración final usada fue de 700 nM. MDH fue incubada en PBS1X, pH 7.0 sola o con una concentración molar igual (700 nM) de SHSP16 o BSA, usada ésta última como control para descartar la actividad inespecífica. La agregación, reflejada como la turbidez de la muestra, fue monitoreada a 360 nm en un Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech), el cual permite mantener la temperatura constante de todas las muestras a través de una unidad accesoria de control de temperatura (Pharmacia Biotech). La absorbancia fue medida a intervalos regulares de tiempo (10 minutos) durante 1 hora.

VII. RESULTADOS

VII.I. ANÁLISIS PROTEÓMICO

7.1.1. Efecto del estrés calórico sobre la movilidad de los parásitos

El primer objetivo fue evaluar el efecto de dos temperaturas de estrés calórico no letal sobre la movilidad de epimastigotes de *T. cruzi*, con el fin de determinar la temperatura a usar en el análisis proteómico. Para lo anterior, se realizaron curvas de inhibición de la movilidad, ésta como un parámetro indirecto de la viabilidad, con epimastigotes de la cepa Ninoa incubados a 37°C y 42°C.

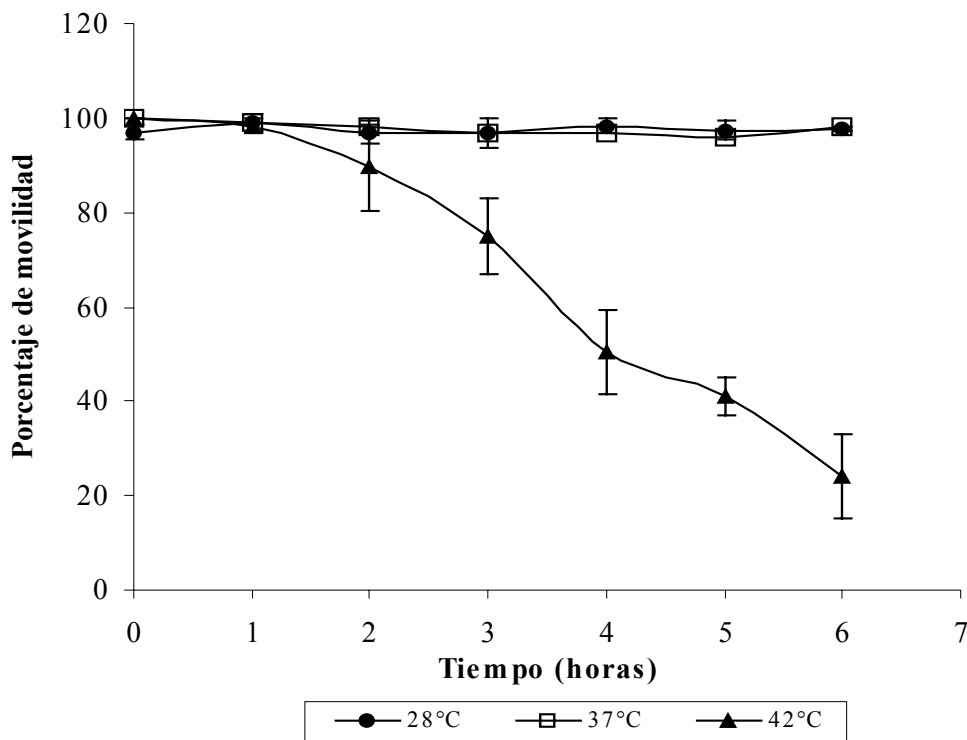


Figura 7.1. Efecto del estrés calórico sobre la movilidad de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Ninoa. Parásitos en crecimiento exponencial (25×10^6 cels/ml $\pm 5 \times 10^6$ cels/ml) fueron incubados a 28°C, 37°C o 42°C durante 6 horas. A intervalos regulares de una hora, alícuotas de cada cultivo fueron tomadas y el número de parásitos móviles e inmóviles fue determinado con un hemocitómetro. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes y son mostrados como el promedio \pm SD.

Como se observa en la Figura 7.1, la temperatura de 37°C no tuvo efecto sobre la movilidad de los parásitos, ya que ésta permaneció prácticamente igual a la mostrada en la condición control (28°C), mientras que el efecto de la temperatura de 42°C

evidenció la disminución en la movilidad de los parásitos que fue dependiente del tiempo. De acuerdo a la curva anterior y a la literatura (de Carvalho *et al.*, 1994; Olson *et al.*, 1994), se decidió incubar a los parásitos a 42°C durante 3 horas para inducir el estrés calórico.

7.1.2. Proteoma de *T. cruzi* en condiciones de estrés calórico

Una vez determinada la temperatura y el tiempo a usar para provocar un estrés calórico, se procedió a realizar el perfil proteico de parásitos expuestos a condiciones experimentales y a condiciones control. Con el fin de evitar variaciones en los resultados, los parásitos siempre se utilizaron en la fase exponencial de crecimiento, con un número igual de células y en todas las etapas del proceso, los controles y los expuestos a 42°C se procesaron paralelamente. El análisis del efecto del estrés calórico sobre el proteoma de epimastigotes de *T. cruzi* se realizó mediante la comparación del perfil proteico de parásitos expuestos y parásitos no expuestos a estrés calórico.

En la Figura 7.2 se muestran geles de electroforesis de 2-D representativos de tres experimentos independientes de la cepa Ninoa en condiciones control (28°C) y de estrés calórico (3 horas a 42°C), teñidos con nitrato de plata. Un promedio de 506 ± 73 puntos ($n=3$) fueron encontrados en los geles donde los extractos proteicos provenían de parásitos incubados a 28°C. En los geles obtenidos de la condición estresada (42°C) se encontraron un promedio de 521 ± 31 puntos ($n=3$). En general, los perfiles proteicos de ambas condiciones fueron muy similares y las principales diferencias radicaron en la densidad diferencial de varias proteínas. Así, se determinó que mientras que algunas proteínas tenían una densidad mayor en la condición estresada en comparación con la condición control, señaladas con círculos rojos en la Figura 7.2, otras proteínas tenían una densidad mayor en la condición control con respecto a la estresada, las cuales son indicadas por círculos verdes. Asimismo, la mayoría de las proteínas tuvo una densidad igual o muy similar en ambas condiciones, señaladas algunas de ellas con círculos azules en la Figura 7.2.

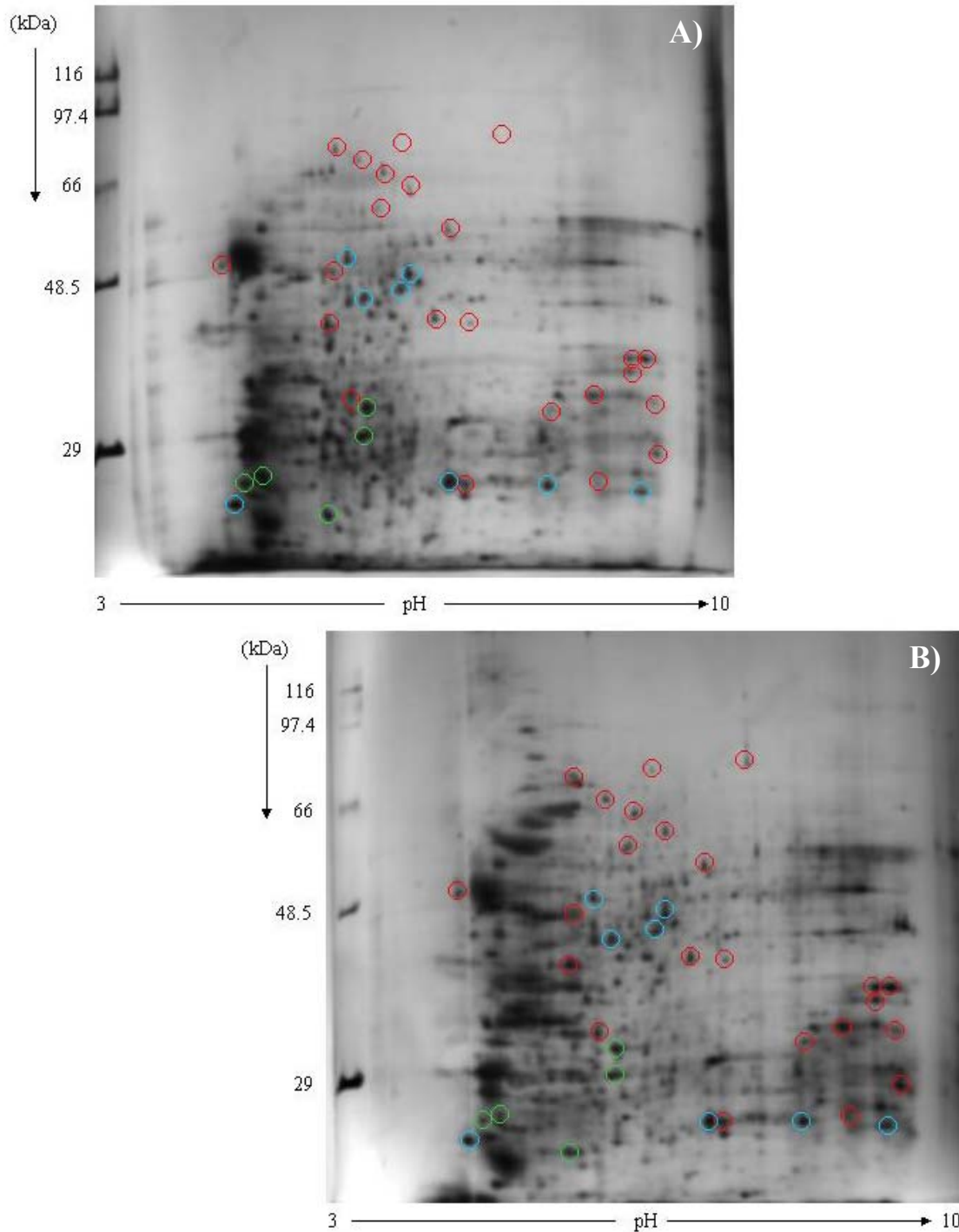


Figura 7.2. Geles bidimensionales de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Ninoa en condiciones control y de estrés calórico. Extractos proteicos totales de parásitos (300 μg) creciendo exponencialmente mantenidos a 28°C (A) o a 42°C (B) durante tres horas fueron separados por IEF en una tira IPG de 17 cm (pH 3-10 NL) y corridos en un gel de poliacrilamida al 10% por 2D-PAGE. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata. Se muestra un gel representativo de tres experimentos independientes de cada condición. En rojo se señalan puntos que aumentaron su densidad en el gel B con respecto a A, en verde los que aumentaron su densidad en A con respecto a B y en azul algunos puntos que permanecieron igual en las dos condiciones (geles A y B).

Por otro lado, el análisis de la distribución de las proteínas por punto isoeléctrico (pI) o masa molecular (MM) de ambas condiciones se muestra en las gráficas de la

Figura 7.3. Tanto en los extractos provenientes de parásitos creciendo a 28°C como de aquellos incubados a 42°C se observa una distribución normal de las proteínas de acuerdo a rangos establecidos de pI o MM. También se observa que dichas distribuciones tienen valores prácticamente idénticos en ambas condiciones.

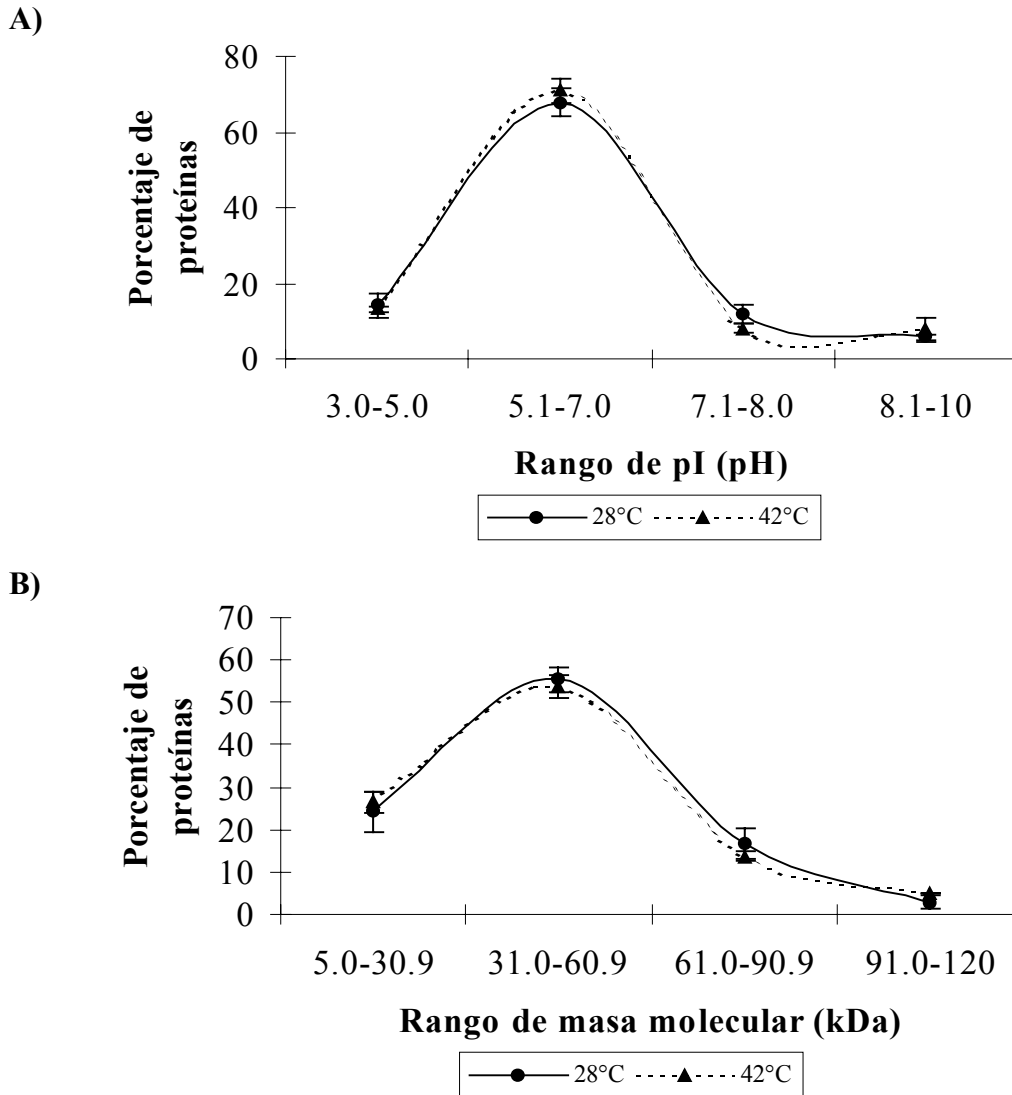


Figura 7.3. Distribución de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) (A) o a su masa molecular (B) en condiciones control y de estrés calórico. Se definieron rangos de pI (en valores de pH) o de masa molecular (kDa) de manera arbitraria y se determinó el porcentaje de proteínas por gel de extractos de parásitos incubados a 28°C y a 42°C, que se agrupaba dentro de dichos rangos. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes y son mostrados como el promedio \pm SD.

7.1.3. Identificación de proteínas por huella peptídica

Utilizando el software PDQuest (BioRad) se realizó un gel maestro de cada condición (control y estresada), el cual es una imagen que contiene todos los puntos encontrados en los gels de los experimentos independientes (Figura 7.4).

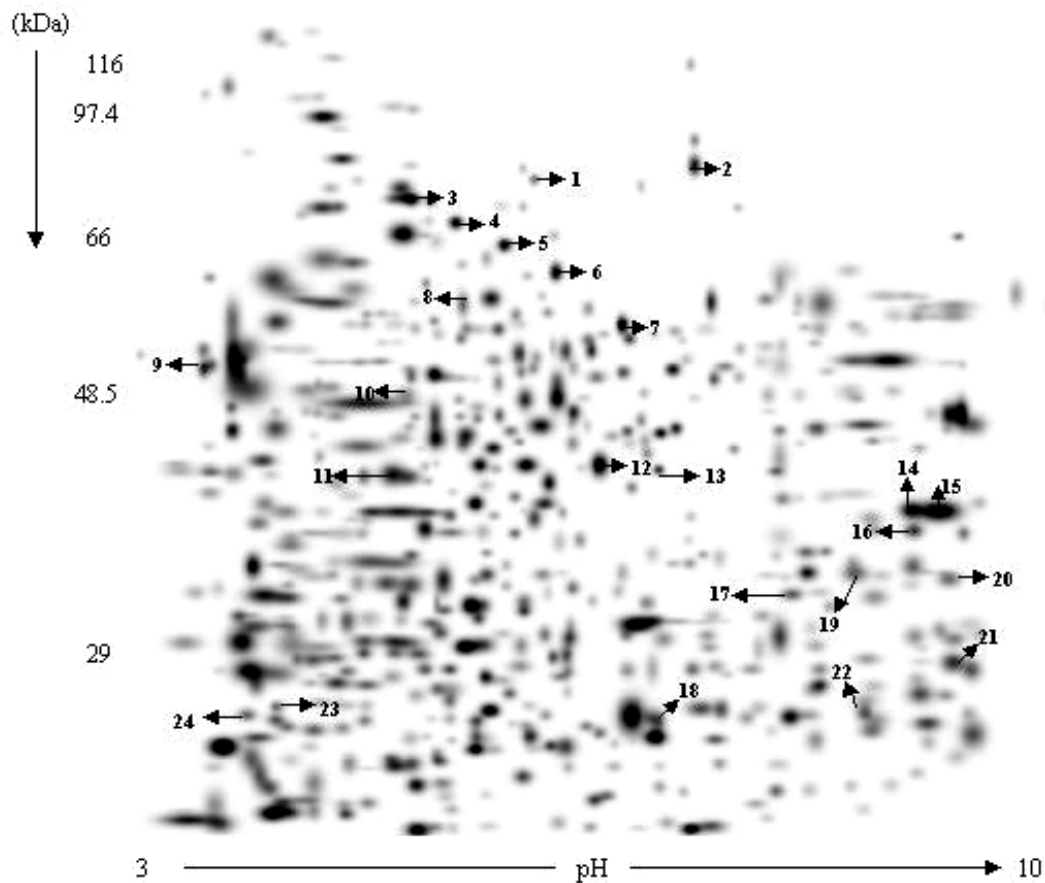


Figura 7.4. Gel maestro de proteínas de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Ninoa. Las imágenes de los gels obtenidos a partir de tres experimentos independientes fueron alineadas una contra otra para generar un gel maestro usando el software PDQuest. Un gel maestro fue generado para la condición control (28°C) y otro para la de estrés calórico (42°C), mostrado en la figura. Las proteínas que se identificaron por huella peptídica son señaladas con un número que corresponde al de la tabla 7.1.

Una vez generados los gels maestros de cada condición, se procedió a la selección de las proteínas a identificar mediante huella peptídica (PMF) a través de espectrometría de masas (MS). Para tal propósito, sólo se consideraron aquellos puntos que se encontraron en los tres experimentos independientes (Figura 7.5), que aumentaron su densidad con respecto al control y que además estuvieran en concentraciones suficientes para su secuenciación por PMF, de tal forma que finalmente, sólo se obtuvo la huella peptídica de 24 de ellas. En la Figura 7.4 se muestran las proteínas que fueron analizadas por MS, cada una con un número que corresponde al de la Tabla 7.1, donde se enlistan.

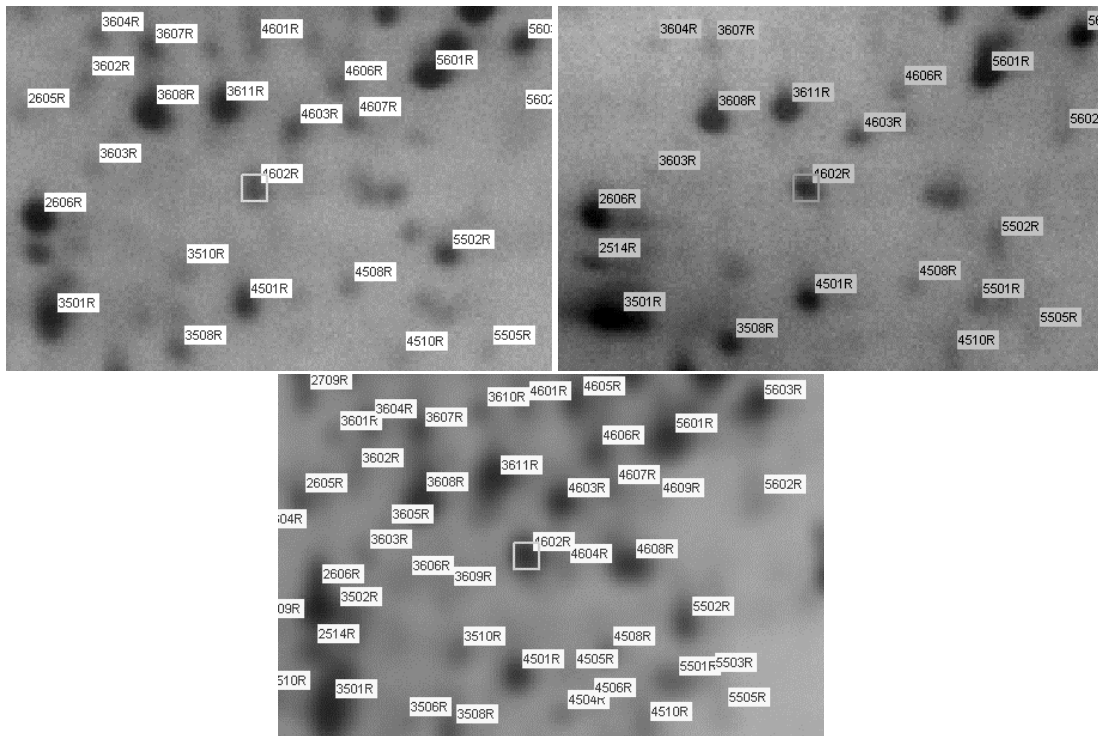


Figura 7.5. Acercamiento de la misma zona de tres geles independientes. Ejemplo del análisis de los geles con el programa PDQuest (BioRad), donde para la secuenciación sólo se consideraron aquéllas proteínas que se encontraron en los tres experimentos independientes.

En la Tabla 7.1, para cada proteína se indica el aumento en la densidad de la proteína a 42°C en número de veces con respecto al control (valor de densidad promedio a 42°C/valor de densidad promedio a 28°C) y normalizado con éste. En la Tabla 7.2, para cada proteína se indica el aumento en la densidad de la proteína a 28°C en número de veces con respecto a la condición estresada (valor de densidad promedio a 28°C/valor de densidad promedio a 42°C). En ambas Tablas también se muestran la MM y el pI teórico y experimental, así como el valor del puntaje o “MOWSE score” (Molecular Weight Search) y el porcentaje de cobertura de la secuencia.

Tabla 7.1. Proteínas de *T. cruzi* que aumentaron su densidad tras el estrés calórico respecto al control y fueron identificadas por huella peptídica. Dichas proteínas se agruparon de acuerdo a su posible función.

Proteína identificada	Número en el gel	Cambio en veces (42°C/28°C)	Experimental		Teórico		MOWSE score	Cobertura de secuencia (%)
			MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI		
Respuesta al estrés y degradación								
Ubiquitina hidrolasa	4	3.01	71.4	5.5	81.1	5.6	1.23e+7	38.6
HSP70	6	1.95	63.4	5.8	70.9	5.8	5611	29.7
Tiol transferasa	10	4.44	48.5	5.5	48.9	5.4	473601	50.5
Chaperona DnaJ	19	1.45	34.9	7.6	35.3	7.6	2349	41.7
Subunidad no ATPasa reguladora de proteosoma	18	4.12	25.7	6.1	25.2	6.0	7.13	41.7
Triparedoxina peroxidasa	22	5.63	25.6	7.8	25.5	7.6	124	35.0
Metabolismo								
ATPasa de retículo endoplásmico transicional	3	1.65	77	5.4	86.1	5.4	7.47e+6	50.5
ATP sintasa	7	1.22	57.6	5.9	53.7	6.0	101	22.8
Deshidrogenasa dependiente de NAD/FAD	11	1.39	43.4	5.3	43.0	5.3	72.6	21.4

Tabla 7.1. Continúa

Proteína identificada	Número en el gel	Cambio en veces (42°C/28°C)	Experimental		Teórico		MOWSE score	Cobertura de secuencia (%)
			MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI		
Glutamato deshidrogenasa	13	1.10	43.4	6.1	43.2	6.0	16.8	24.5
ATPasa de tipo P translocadora de calcio	16	1.27	37.9	8.2	37.3	8.3	62.1	28.2
Hidroxiacil α -L-aromática deshidrogenasa	17	1.49	34.1	6.9	33.7	6.8	204	25.3
Traducción de proteínas								
Cisteinil-tRNA sintetasa	2	6.46	85.1	6.2	89.2	6.1	28.9	13
Transporte intracelular								
Proteína activadora de GTPasa Rab6	12	1.24	44.3	5.8	44.2	5.8	4739	25.7
Proteínas de superficie								
Proteasa de superficie gp63	5	1.30	66	5.6	78.6	5.7	3.25e+9	46.1
Glucoproteína de superficie Tc-85/16 (fragmento)	8	3.13	61.5	5.6	66.8	5.5	1.81	27.6
Proteína de superficie asociada a mucina (MASP)	9	2.03	53	4.2	50.0	4.4	692	29.3

Tabla 7.1. Continúa

Proteína identificada	Número en el gel	Cambio en veces (42°C/28°C)	Experimental		Teórico		MOWSE score	Cobertura de secuencia (%)
			MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI		
Proteínas hipotéticas								
Proteína hipotética	1	3.77	82.3	5.7	88.3	5.6	1160	18.9
Proteína hipotética	14	1.78	39.4	8.2	39.5	8.2	5713	24.3
Proteína hipotética	15	2.2	39.4	8.5	39.2	8.4	1197	41.2
Proteína hipotética	20	1.07	34.6	8.7	34.8	8.7	3723	44.3
Otras proteínas								
Retrotransposon hot spot	21	1.14	28.8	8.7	29.0	8.6	1456	36.1

Tabla 7.2. Proteínas de *T. cruzi* que disminuyeron su densidad tras el estrés calórico respecto al control y fueron identificadas por huella peptídica. Dichas proteínas se agruparon de acuerdo a su posible función.

Proteína identificada	Número en el gel	Cambio en veces (28°C/42°C)	Experimental		Teórico		MOWSE score	Cobertura de secuencia (%)
			MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI		
Proteínas de superficie								
Proteína de superficie asociada a mucina (MASP)	23	2.4	26.6	4.8	26.5	4.8	29.4	45.3
Mucina	24	1.7	26	4.5	25.6	4.5	2.69	38.7

VII.II. ANÁLISIS MOLECULAR

7.2.1. Identificación del gen *SHSP16* en *T. cruzi*

Previo a la anotación completa del genoma de *T. cruzi*, se llevó a cabo en la base de datos del proyecto de secuenciación preliminar (<http://TcruziDB.org>), una búsqueda heteróloga de alguna HSP de bajo peso molecular utilizando la secuencia deducida de aminoácidos de una α -HSP de 16 kDa de otro protista, *Entamoeba histolytica* (Caballero-Franco, 2002). El análisis utilizando el algoritmo tblastn contra la base de datos preliminar, arrojó tanto una secuencia de aproximadamente 100 aminoácidos, cuya identidad con aquella de *E. histolytica* fue de 23% y similitud de 45% (Figura 7.6), como la región del genoma donde se localizaban los nucleótidos que traducían dicha secuencia.

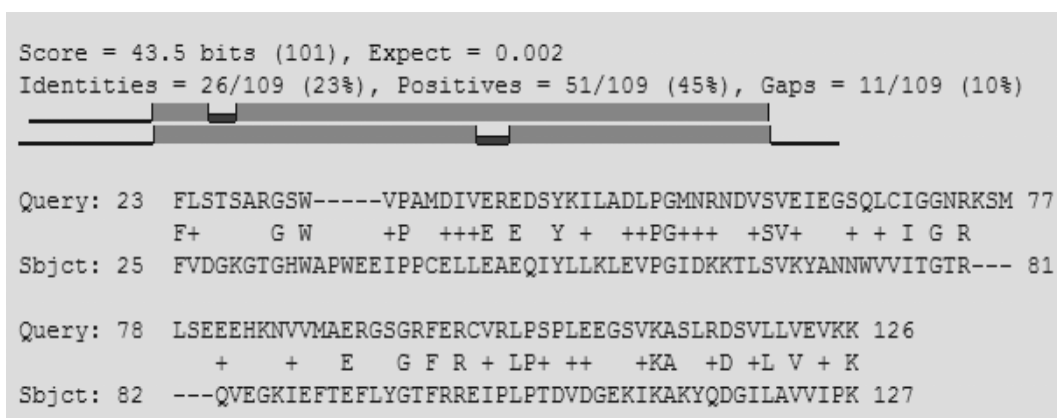


Figura 7.6. Secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la base de datos preliminar del proyecto de secuenciación del genoma de *T. cruzi* que representó el mayor porcentaje de identidad con la secuencia de HSP16 de *E. histolytica*.

Con el fin de determinar marcos de lectura abiertos (ORF) putativos, se realizó un análisis de la secuencia nucleotídica arrojada y regiones 5' y 3' adyacentes usando el programa ORF Finder, con el cual se encontró un ORF de 429 pares de bases (Figura 7.7) que codificaba un supuesto polipéptido de 142 aminoácidos (que incluía los residuos de aminoácidos que presentaron 23% de identidad con la α -HSP de *E. histolytica*) y cuya comparación con la base de datos de proteínas del GenBank reveló una identidad de secuencia (29-35%) con sHSPs de otros organismos distantemente relacionados (plantas y bacterias), lo cual apoyó la hipótesis de que se trataba de una sHSP.

Corriente arriba del gen de sHSP se localizó una región intergénica de 587 nucleótidos, y corriente arriba de ésta una región codificante de 1911 nucleótidos para una fosfodiesterasa (PDE) de 637 residuos de aminoácidos (56% de identidad con fosfodiesterasa de *T. cruzi*). Corriente abajo de sHSP se determinó una región intergénica de 600 nucleótidos y después de ésta, la secuencia del gen 60s ribosomal L13 de 657 nucleótidos (Figura 7.7).

7.2.2. Amplificación y secuenciación del gen *SHSP16*

Así, a partir de la secuencia de nucleótidos identificada, se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos, sHSPTc-F y sHSPTc-R, de 34 nucleótidos cada uno (Figura 7.8), que permitieran la amplificación del gen completo en parásitos de *T. cruzi*.

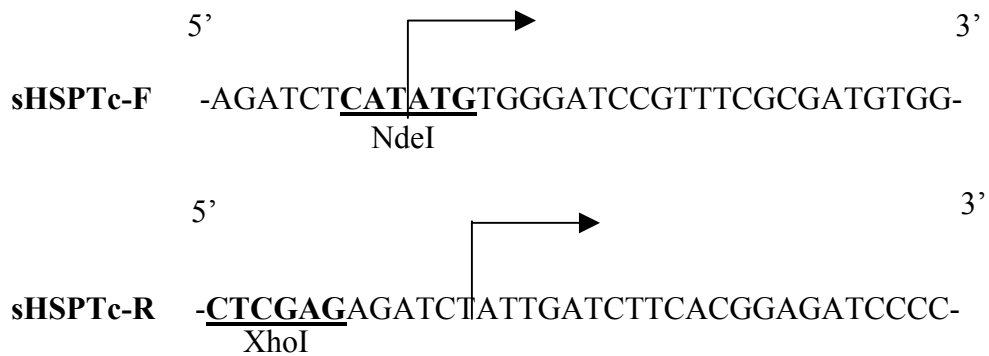


Figura 7.8. Secuencia de oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación del gen *SHSP16* en *T. cruzi*. En negritas y subrayados se encuentran los sitios de restricción adicionados, con una flecha se indica a partir de qué nucleótido de la secuencia, éstos forman parte de la región codificante.

Debido a los 21 nucleótidos añadidos a los oligonucleótidos, los cuales no pertenecían a la secuencia, el amplificado resultante debía tener 450 pares de bases (pb) (429+21=450).

Las reacciones de PCR con los oligonucleótidos diseñados se llevaron a cabo utilizando DNA genómico aislado de tres cepas mexicanas de *T. cruzi* caracterizadas en nuestro laboratorio: Ninoa, Querétaro y Ver-6, dando como resultado en cada una de ellas una sola banda del tamaño esperado de 450 pb, por lo que, como se puede observar en la Figura 7.9, la amplificación fue específica.

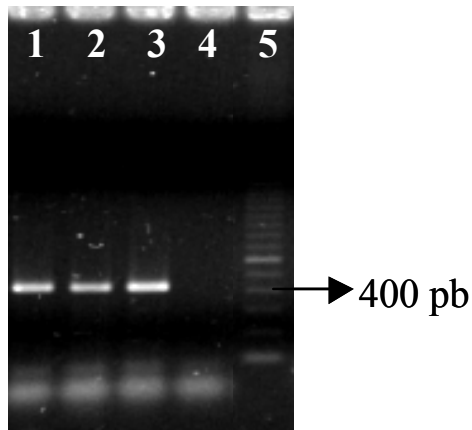


Figura 7.9. Amplificado del gen *SHSP16*. Gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los amplificados de 450 pb que corresponden al gen *SHSP16* para cada una de las tres cepas de *T. cruzi* 1) Ninoa; 2) Querétaro; 3) Ver-6; 4) Control negativo; 5) 100 pb DNA Ladder (Gibco).

Los amplificados obtenidos de cada cepa fueron clonados en el vector pCR2.1 (Invitrogen) con el fin de secuenciarlos. La secuencia del gen completo, así como la deducida de aminoácidos de la cepa Querétaro se muestran en la Figura 7.10. El polipéptido posee una masa molecular teórica de 15.9 kDa y un punto isoeléctrico aproximado de 7.8. Asimismo, el alineamiento de la secuencia de aminoácidos con el programa CD-Search (Conserved Domain Search) (NCBI) reveló la presencia de un dominio α -cristalino de 93 aminoácidos (Figura 7.10), considerándose entonces como un nuevo miembro de la familia de sHSPs del tipo α -cristalino. Basado en la masa molecular teórica (15.9 kDa) y de acuerdo a la literatura (Clayton *et al.*, 1998), se designó a la proteína *T. cruzi* SHSP16 y a su correspondiente gen, *SHSP16*.

```

atgtgggatccgtttcgcatgtggagcgcacttctcaatcgcagtcagtcaccggcacg      63
  M W D P F R D V E R L L N R M Q S V T G T
agttttctctccacatccgctcgtggatcatgggtgccggcgatggacattgtcgagagggag 126
  S F L S T S A R G S W V P A M D I V E R E
gacagctacaagattcttgctgacttgcccggcatgaaccgcaacgacgtctctgtggagatt 189
  D S Y K I L A D L P G M N R N D V S V E I
gagggcagccaactgtgcattggaggcaaccgcaagtccatgctgagtgaagaggaacacaaa 252
  E G S Q L C I G G N R K S M L S E E E H K
aacgttgatggcagagcgcgggttccgggagatttgagcgtgctgctgacttccctcacc 315
  N V V M A E R G S G R F E R C V R L P S P
cttgaagagggcagcgtgaaggccagcctgctgattcgggtgctgctgctggaggtgaagaaa 378
  L E E G S V K A S L R D S V L L V E V K K
gtgacggagcgcgtgcggaagcgcctcggggatctccgtgaagatcaattag          429
  V T D A V R K R S G I S V K I N -

```

Figura 7.10. Secuencia codificante completa y secuencia deducida de aminoácidos del gen *SHSP16* de *T. cruzi* cepa Querétaro. La numeración de los nucleótidos es mostrada a la derecha. Los codones de inicio y terminación de la traducción están subrayados. La secuencia deducida de aminoácidos (142 residuos de aminoácidos) se encuentra debajo de la secuencia de nucleótidos, cada codón con su correspondiente aminoácido. El dominio α -cristalino está sombreado.

7.2.3. Análisis de la secuencia nucleotídica

El análisis realizado en la base de datos pública proporcionada por el consorcio de secuenciación del genoma de *T. cruzi* (<http://TcruziDB.org>) reveló que el gen *SHSP16* se encuentra en una sola copia.

Asimismo, con el objeto de establecer la existencia o no de polimorfismos entre las cepas, se realizó un alineamiento múltiple con las tres secuencias de las cepas mexicanas y las secuencias anotadas para los dos haplotipos de CL-Brener (<http://TcruziDB.org>), con la cual se realizó el proyecto de secuenciación del genoma. Las secuencias nucleotídicas de cada haplotipo de CL-Brener (nombrados arbitrariamente aquí CL-Brener/1 y CL-Brener/2), contienen dos variaciones entre sí en los nucleótidos 164 y 327. Así, las variaciones entre las secuencias de las cuatro cepas son tres y se muestran en la Tabla 7.3. La primera es una sustitución silenciosa de A (Ninoa y Querétaro) a C (Ver-6 y CL-Brener/1 y CL-Brener/2) en el nucleótido 30. La segunda es una sustitución de sentido erróneo de A (Ninoa y Querétaro) a G (Ver-6 y CL-Brener/1) en la posición 164, resultando en el cambio de asparagina por serina. Por último, en el nucleótido 327, una sustitución silenciosa de C (Ninoa y Querétaro) a A (CL-Brener/2). De las variaciones anteriores se determinó lo siguiente: 1) las secuencias pertenecientes a las cepas Ninoa y Querétaro son exactamente idénticas entre sí; 2) la secuencia de Ver-6 es justamente igual a la secuencia de CL-Brener/1; y 3) la secuencia conservada entre Ninoa y Querétaro no es igual a ninguna de las formas alélicas de CL-Brener.

Tabla 7.3. Lista de sitios polimórficos en la secuencia nucleotídica de *SHSP16*

Cepa	Posición del nucleótido en la secuencia		
	30	164	327
<i>T. cruzi I</i>			
Ninoa	A	A	C
Querétaro	A	A	C
<i>T. cruzi II</i>			
Ver-6	C	G	C
CL-Brener/1	C	G	C
CL-Brener/2	C	A	A

7.2.4. Predicción de estructura secundaria

Se realizó la predicción de estructura secundaria de la secuencia deducida de aminoácidos de SHSP16 utilizando tres programas distintos: PROF, PFAM y PSIPRED (Figura 7.11). Como se observa, con los tres programas utilizados la predicción de la estructura secundaria de SHSP16 fue parecida, con las variaciones principales correspondiendo a la presencia y longitud de α -hélices. Sin embargo, la característica más importante de las predicciones fue que todas mostraron una estructura rica en cadenas β .

```
PROF: CCCCCCCHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCEEEEEEECCCCCCCCEE
PFAM: CCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCEEEEEEECCCCCHHHEE
PSIP: CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCEEEEEEECCCCCHHHEE
aa:  MWDPFRDVERLLNRMQSVTGTSTFSLTSARGSWVPAMDIVEREDSYKILADLPGMNRNDVS
      10          20          30          40          50          60

PROF: EEEECCEEEEEEECCCCCCCCCCCCCEEEEEEECCCEEEEEEECCCCCCCCCEEEEECCCEE
PFAM: EEEECCEEEEEEECCCCCCCCCCCCCEEEEEEECCCCCEEEEEEECCCCCHHHEEEEEECCEE
PSIP: EEEECCEEEEEEECCCCCCCCCCCCCEEEEEEECCCCCEEEEEEECCCCCHHHEEEEEECCEE
aa:  VEIEGSQLCIGNRKSMLEEEHKNVMAERGSGRFERCVRLPSPLEEGSVKASLRDSVL
      70          80          90          100         110         120

PROF: EEEEECCCCCCCCCCEEEEEEEEC
PFAM: EEEEECCCCCCCCCCEEEEEEEEC
PSIP: EEEEECCCCCCCCCCEEEEEEEEC
aa:  LVEVKKVTD AVRKRSGISVKIN
      130         140
```

Figura 7.11. Predicción de estructura secundaria de SHSP16 utilizando tres programas distintos: PROF (PROF-Secondary Structure Prediction System), PFAM (Protein Families Database) y PSIP (PSIPRED) (Predict Secondary Structure), donde H=alfa hélices, E=cadenas beta, C=colas azarosas.

7.2.5. Análisis de la secuencia de aminoácidos

La secuencia deducida de aminoácidos de SHSP16 fue alineada con sHSPs homólogos de otros parásitos protozoarios, con la HSP16.9 de trigo, con los α -cristalinos y sHSP de 22 kDa de humano. La secuencia de *T. cruzi* mostró la identidad más alta con la de *T. brucei* (55.6%) y la más baja con el α B-cristalino de humano (16.4%) (Figura 7.12 y Tabla 7.4). El porcentaje de identidad entre las proteínas aumentó al alinear únicamente su dominio α -cristalino (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Valores de identidad y similitud de distintas α -HSPs con SHSP16 de *T. cruzi*

Organismo	Secuencia completa		Dominio α -cristalino
	Identidad (%)	Similitud (%)	Identidad (%)
<i>T. brucei</i>	55.6	80.9	63.3
<i>L. major</i>	35.6	65.5	44.5
<i>T. gondii</i>	27.5	49.1	39.3
Trigo	25.0	49.0	32.2
<i>E. histolytica</i>	21.0	50.6	24.1
<i>H. sapiens</i>	17.3	42.3	21.2
HalphaA	17.1	44.7	21.1
HalphaB	16.4	47.1	20.5

Motivos de secuencia conservados característicos de las sHSPs están presentes en las secuencias alineadas, tanto aquéllos propios de la familia en general, como motivos particulares de grupo de organismos. Todas las secuencias poseen el motivo I/V-X-I/V en el extremo C-terminal (aminoácidos 199-201 en el alineamiento, Figura 7.12), así como la región constituida por los aminoácidos P-(X₁₄)-G-V-L en el C-terminal del dominio α -cristalino (posiciones 159-177 del alineamiento). En cuanto a motivos de secuencia conservados característicos de sHSPs no animales multicelulares descritos previamente se encuentran el duplete E-R (residuos 146-147), el triplete L-P-G, que para el caso de las secuencias de los cinco protistas analizados y la de trigo se podría modificar a D-L-P-G (aminoácidos 102-105) y los residuos G y A (posición 150 y 169, respectivamente) (Figura 7.12). Dentro de los residuos conservados únicamente en las secuencias de sHSPs del grupo de los cinetoplastidos (*T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*), resalta la existencia de dos residuos de cisteína (C), los cuales están presentes en la misma posición en las tres especies (aminoácidos 122 y 155 del alineamiento, Figura 7.12).

Asimismo, en la Figura 7.12 se señalan arriba del alineamiento con una línea gruesa los residuos de la proteína que muy posiblemente formen α -hélices y con flechas, los que constituyan cadenas β , según la predicción del programa PROF-Secondary Structure Prediction System.

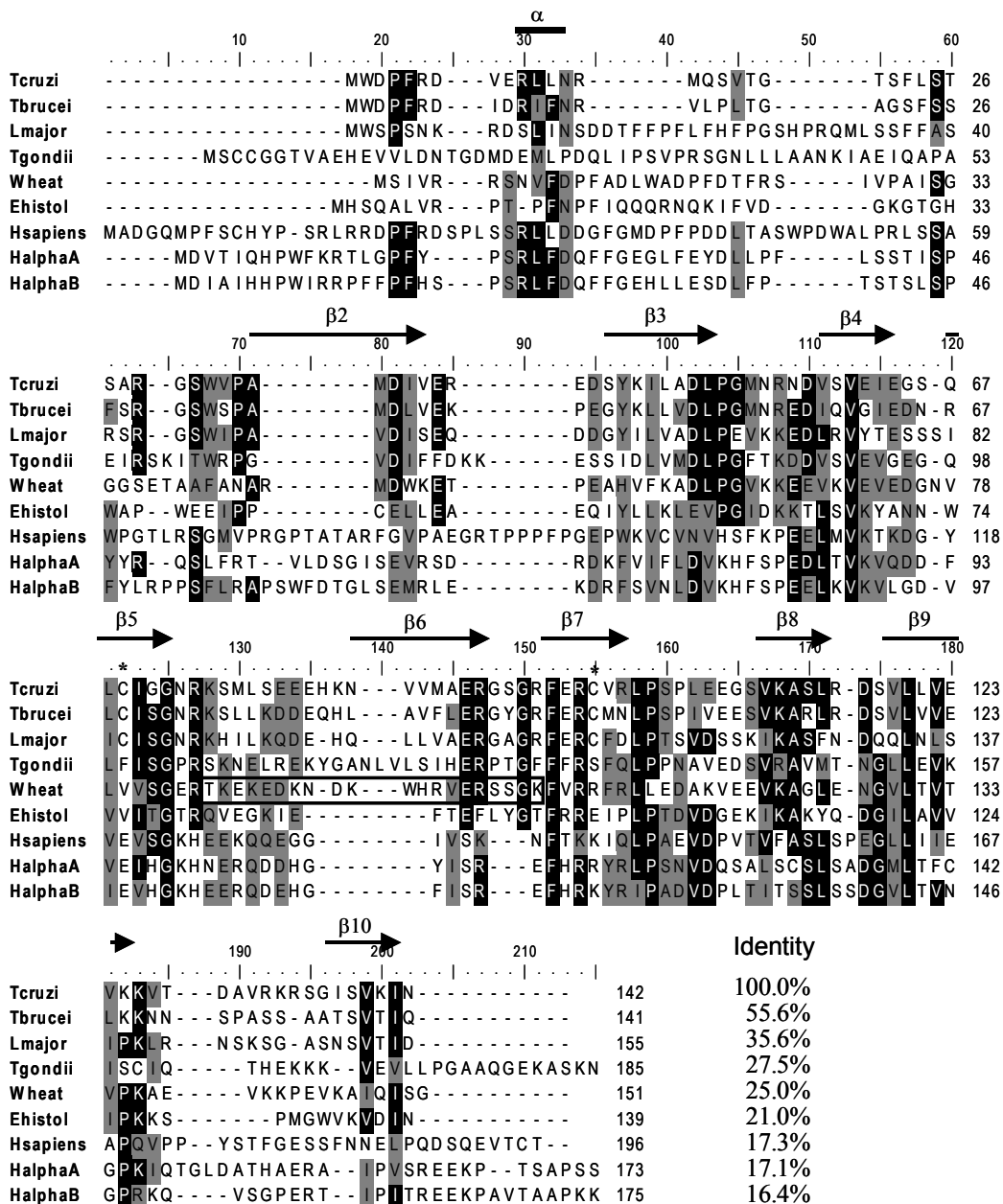


Figura 7.12. Alineamiento de SHSP16 con α -HSPs homólogas de especies de parásitos relacionados, planta y humano. El alineamiento se llevó a cabo con Clustal W (versión 1.4), donde las líneas punteadas representan gaps introducidos por el programa. Los residuos de aminoácidos mostrados en negro son idénticos en al menos 50% de las secuencias, mientras que los grises son químicamente conservados en la mitad de las secuencias. La longitud de las secuencias es señalada al final de cada una de éstas, al igual que el porcentaje de identidad con respecto a SHSP16 de *T. cruzi*. Los residuos de cisteína conservados en el grupo de los cinetoplastidos están señalados con un asterisco. La estructura secundaria para SHSP16 asignada con el programa PROF-Secondary Structure Prediction System se muestra arriba del alineamiento, donde las cadenas β están indicadas como flechas y la α -hélice como una línea gruesa. Las cadenas β están numeradas de acuerdo a las correspondientes cadenas β de la estructura cristalizada de HSP16.9 de trigo, el asa de dimerización de HSP16.9 se demarca por un rectángulo.

El alineamiento de la Figura 7.12 incluyó las siguientes nueve secuencias: SHSP16 de *T. cruzi* (No. de acceso GenBank DQO69060) (indicada como Tcruzi); HSP20 de *T. brucei* (No. de acceso GenBank AAX70515) (indicada como Tbrucei); HSP20 de *L. major* (No. de acceso GenBank AAZ09702) (indicada como Lmajor); HSP20 de *T. gondii* (No. de acceso GenBank AAT66039) (indicada como Tgondii); HSP16.9 de *Triticum aestivum* (No. de acceso GenBank CAA45902) (indicada como Wheat); HSP20 de *Entamoeba histolytica* (No. de acceso TREMBL Q8MZU6) (indicada como Ehistol); HSP22 de *Homo sapiens* (No. de acceso GenBank AAH02673) (indicada como Hsapiens); α A-cristalino de *H. sapiens* (No. de acceso GenBank NP_000385) (indicada como HalphaA); y α B-cristalino de *H. sapiens* (No. de acceso GenBank AAH07008) (indicada como HalphaB).

7.2.6. Expresión del mRNA de *SHSP16* en respuesta al estrés calórico

Con el fin de investigar la expresión genética de *SHSP16* en presencia de estrés calórico se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativo para analizar los niveles de mRNA. Para dicho ensayo se utilizó RNA total extraído de epimastigotes de la cepa Querétaro en fase exponencial de crecimiento que fueron incubados durante 3 horas a diferentes temperaturas de estrés calórico: 37°C, 39°C ó 42°C. Como control se usó el RNA de parásitos incubados a 28°C. Con el fin de asegurar que cantidades iguales de cDNA fueran comparadas en cada tratamiento, el mRNA de la subunidad S4 ribosomal, que constituye un gen constitutivo (Cevallos *et al.*, 2005), fue evaluado en paralelo y utilizado para la normalización de las muestras.

Un amplificado del tamaño esperado para *SHSP16* (450 pb) estuvo presente en todas las condiciones, por lo que un nivel basal de expresión fue detectado desde la condición control de crecimiento (Figura 7.13A), sin embargo, una inducción del mRNA de *SHSP16* fue evidente en los parásitos estresados a 37°C, 39°C y 42°C, con valores similares en las distintas temperaturas de estrés, como demostró el análisis densitométrico de las muestras (Figura 7.13B).

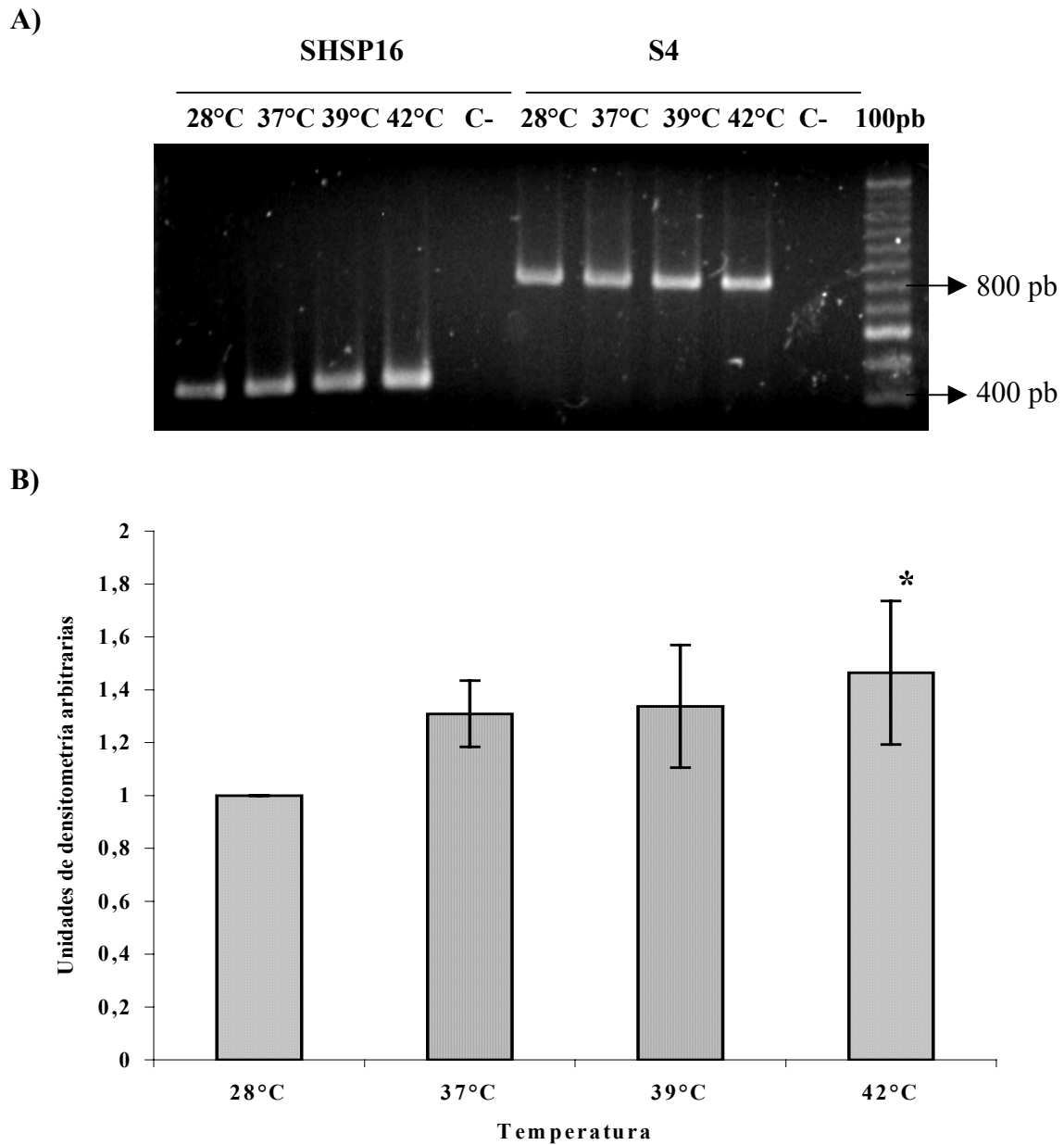


Figura 7.13. Análisis de la expresión del mRNA de *SHSP16* en condiciones de estrés calórico a través de RT-PCR semicuantitativo. A) El RNA total de epimastigotes de la cepa Querétaro creciendo en condiciones normales (28°C) o estresadas (37, 39 or 42° C) durante 3 horas fueron reverso-transcritos y amplificados por PCR. Los productos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. El gen S4 fue usado como control. Al menos tres experimentos independientes fueron realizados. Se muestra un experimento representativo. B) Análisis densitométrico de la expresión del mensajero de *SHSP16*. Los valores obtenidos para cada banda de PCR fueron normalizados con los valores derivados de la señal de S4. Los datos son mostrados como el promedio de tres experimentos independientes \pm SD. Para la comparación de los datos mediante análisis estadístico se utilizó la prueba t de Student, $P < 0.05$.

proteína de fusión (cola de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal) de 152 aminoácidos, con una masa molecular teórica calculada de 17.2 kDa. Después de una y dos horas de inducción, los cultivos de cada condición fueron cosechados y centrifugados para separar el precipitado del sobrenadante. La fracción insoluble del extracto proteico se analizó por SDS-PAGE en un gel al 15%, en el cual se detectó una sobreexpresión de la proteína del tamaño esperado (17 kDa) aún en la primera hora de la inducción (Figura 7.15, línea 3). De manera particular, también se observó que incluso en la ausencia de la inducción por IPTG se detectó la proteína (Figura 7.15, línea 4).

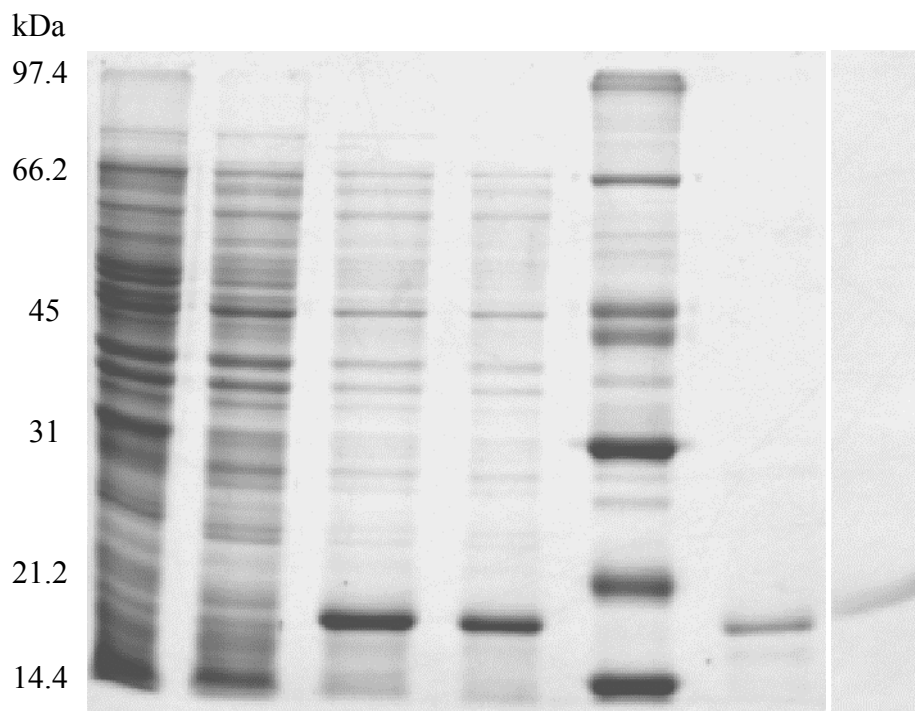


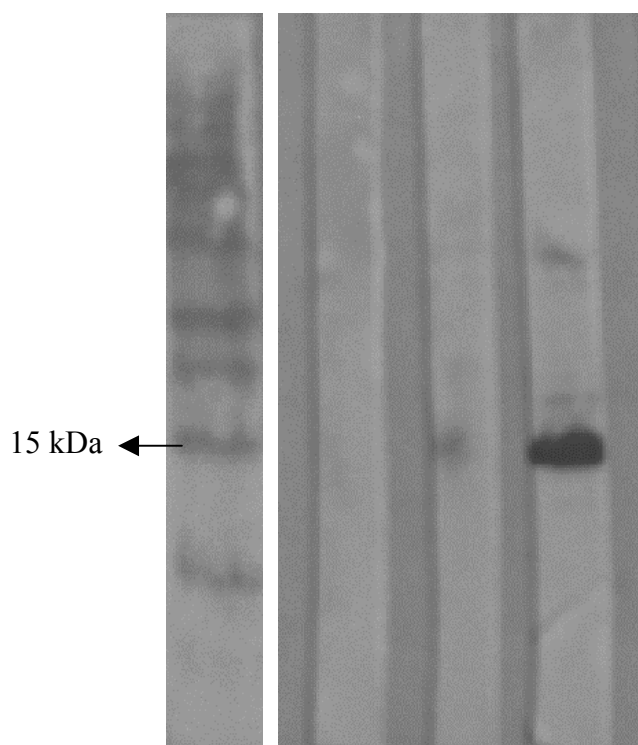
Figura 7.15. Análisis por SDS-PAGE de la expresión y purificación de SHSP16 recombinante. Los distintos extractos proteicos fueron separados en un gel de poliacrilamida al 15% y detectados por la tinción con azul de Coomassie. 1) Extracto proteico total de *E. coli* BL21 Star (DE3) inducido con 0.4mM de IPTG (20 µg); 2) extracto de células de *E. coli* BL21 Star (DE3) conteniendo el vector de expresión pET-23a más 0.4mM de IPTG (20 µg); 3) lisado de células bacterianas transformadas con pET23a/SHSP16 e inducidas con 0.4mM de IPTG (20 µg); 4) lisado de células bacterianas transformadas con pET23a/SHSP16 sin IPTG (20 µg); 5) marcador de masa molecular; 6) SHSP16 purificada (10 µg); 7) SHSP16 purificada separada en condiciones no reductoras (10 µg). La masa específica de los marcadores es indicada a la izquierda.

Posteriormente, la proteína de fusión fue parcialmente purificada (en aproximadamente un 90%) utilizando una columna de afinidad acoplada con sulfato de níquel, al cual se pegan las colas de histidinas (Figura 7.15, línea 6), con el objeto de producir anticuerpos contra ésta y realizar ensayos de actividad *in vitro*.

Con el fin de determinar si los dos residuos de cisteínas presentes en la secuencia de SHSP16 de *T. cruzi* y conservados en el grupo de los cinetoplástidos (Figura 7.12) participan en la formación de agregados moleculares como serían los dímeros a través de la generación de puentes disulfuro, se realizó una electroforesis de la proteína purificada en condiciones no reductoras, donde la única banda visible fue la correspondiente al monómero (17 kDa) y no se detectó ninguna otra banda de mayor tamaño (Figura 7.15, línea 7).

Por otra parte, también se realizó un análisis de Western-blot para confirmar la identidad de la proteína sobreexpresada utilizando un anticuerpo monoclonal Anti-His (Penta-His), el cual es usado para la detección de proteínas recombinantes llevando colas de 6 histidinas. Como puede observarse (Figura 7.16), sólo en el extracto proteico de las células BL21 (DE3) llevando la construcción pET23a/sHSPTc se detectó una señal muy intensa, correspondiendo además a la masa molecular aproximada de la proteína de 17 kDa.

Figura 7.16. Western blot para detectar la proteína de fusión recombinante utilizando un anticuerpo monoclonal Anti-His (QIAGEN). 1) Extracto proteico total de *E. coli* BL21 Star (DE3) inducido con 0.4mM de IPTG (20 μ g); 2) extracto de células de *E. coli* BL21 Star (DE3) conteniendo el vector de expresión pET-23a más 0.4mM de IPTG (20 μ g); 3) lisado de células bacterianas transformadas con pET23a/SHSP16 e inducidas con 0.4mM de IPTG (20 μ g).



7.2.8. Análisis de Western blot

Con el objeto de determinar si productos de proteína funcional estaban siendo traducidos a partir de los transcritos de *SHSP16*, se produjo en cobayos un anti-suero policlonal contra SHSP16 recombinante. El análisis de Western blot utilizando extractos

del parásito reveló que la proteína nativa se expresa en epimastigotes de *T. cruzi*, sin embargo, en éstos se obtuvo un perfil de bandas migrando más lentamente al esperado, siendo la más intensa una banda de aproximadamente 62 kDa (Figura 7.17, línea 1) la cual correspondería con la presencia en el parásito de un tetrámero de SHSP16, cuya masa molecular teórica es de 64 kDa. Las otras bandas reconocidas (de masas moleculares mayores) pudieran representar reacciones cruzadas con otras proteínas o agregados de la proteína más grandes. Los ensayos utilizando extractos de la proteína purificada mostraron la presencia de una única banda del tamaño esperado (17 kDa) (Figura 7.17, línea 2).

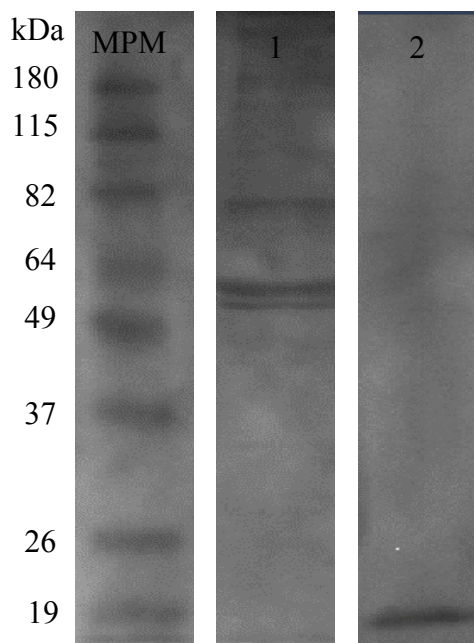


Figura 7.17. Análisis de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-SHSP16 producido en cobayo. 1) extracto proteico total de epimastigotes de *T. cruzi* (10 μ g); 2) SHSP16 recombinante purificada y dializada (10 μ g).

Del mismo modo, se realizó un análisis de Western blot para determinar la expresión de SHSP16 en condiciones de estrés calórico, utilizando epimastigotes en la fase exponencial de crecimiento expuestos a 42°C durante 3 horas. Como se observa en la Figura 7.18, al comparar la expresión de la proteína de parásitos mantenidos en condiciones control (28°C), hubo un ligero aumento de la expresión de SHSP16 en epimastigotes cultivados a 42°C, pues el análisis densitométrico reveló una diferencia mínima (0.2 veces) en la expresión de la proteína en la condición estresada comparada con el control.

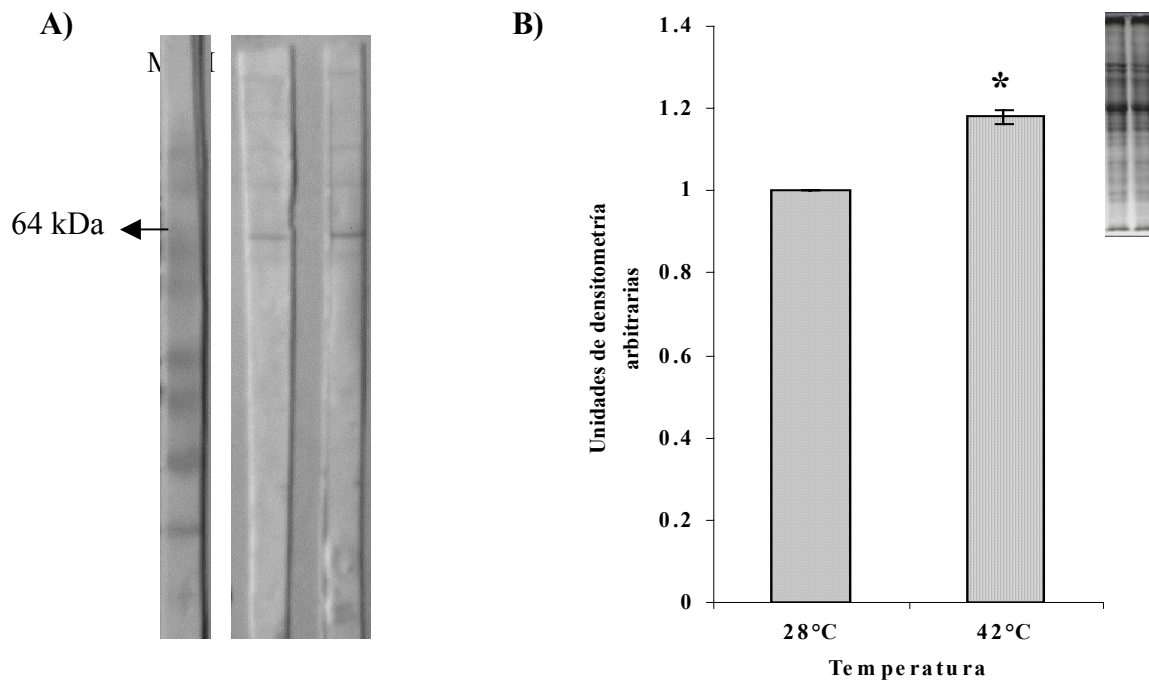


Figura 7.18. Análisis de la expresión de SHSP16 en condiciones de estrés calórico. A) Análisis de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-SHSP16 producido en cobayo: 1) extracto proteico total de epimastigotes de *T. cruzi* incubados a 28°C durante 3 horas (10 µg); 2) extracto de proteínas de epimastigotes de *T. cruzi* expuestos a 42°C por 3 horas (10 µg). Se muestra un experimento representativo. B) Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en cada condición normalizadas con el perfil de proteínas totales teñidas con azul de Coomassie, mostrado en la equina superior derecha de la gráfica. Los datos representados son el promedio de dos experimentos independientes \pm SD. Para la comparación de los datos mediante análisis estadístico se utilizó la prueba t de Student, $P < 0.05$.

7.2.9. Actividad de chaperona *in vitro* de SHSP16

Para examinar la capacidad de SHSP16 de actuar como una chaperona molecular *in vitro* se usó el ensayo de agregación térmica de la enzima malato deshidrogenasa (MDH). La incubación de MDH a 43°C resultó en la agregación de la enzima inducida por calor y se detectó por el incremento en la cantidad de luz dispersada a 320 nm (Figura 7.19). En la ausencia de SHSP16 o en la presencia de la proteína control con ninguna actividad de chaperona como sería BSA, la MDH sufrió una agregación significativa a los 30 minutos de incubación, sin embargo, la adición de una concentración molar equivalente de SHSP16 (1:1), suprimió casi completamente la agregación de MDH (Figura 7.19), actuando por lo tanto, como una chaperona molecular eficiente *in vitro*.

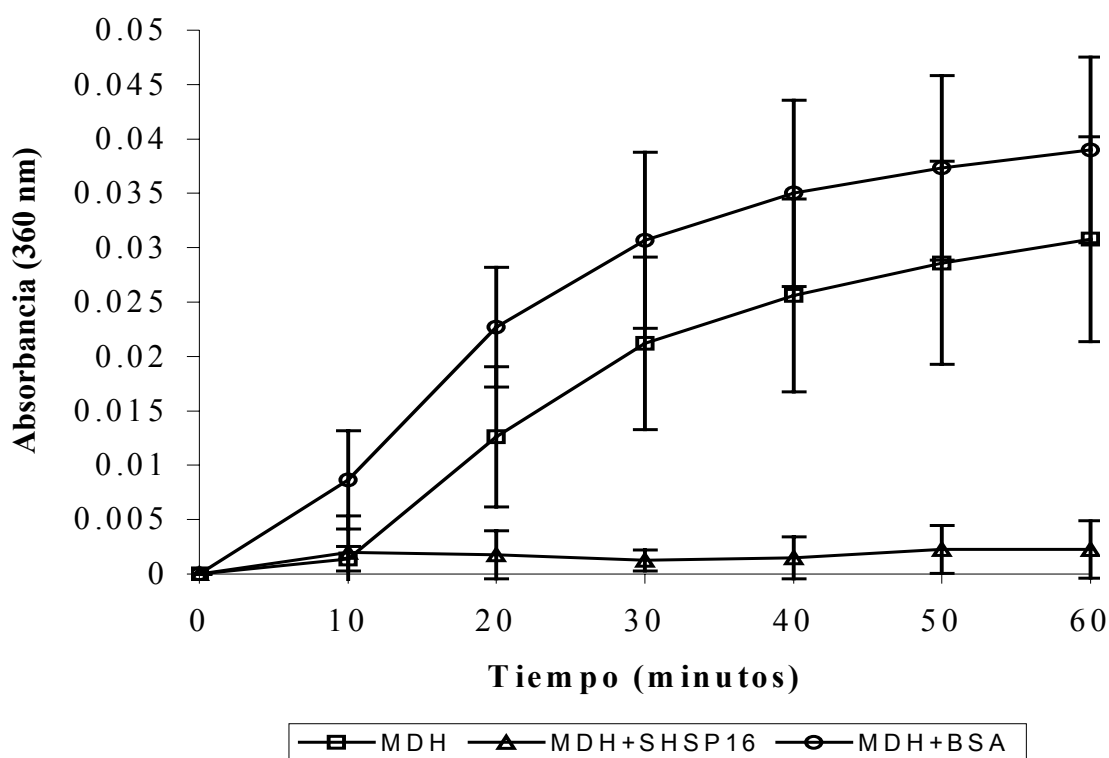


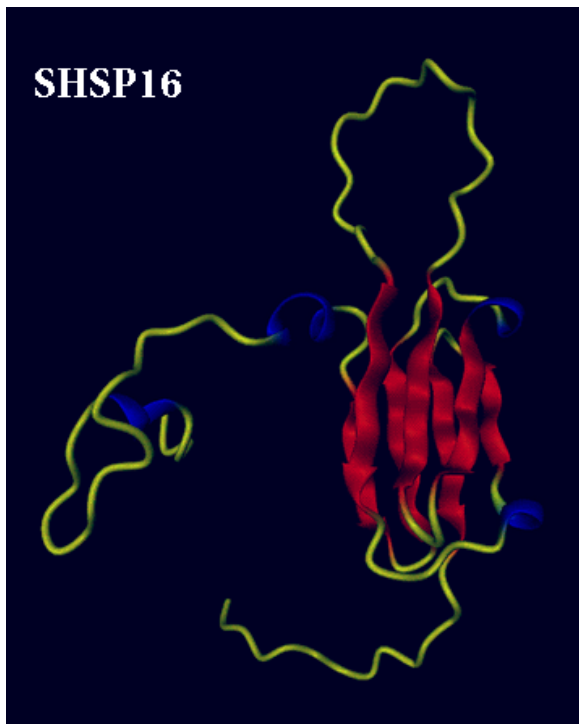
Figura 7.19. Actividad de chaperona *in vitro* de SHSP16. El efecto de SHSP16 sobre la agregación inducida por calor de MDH fue determinado por la cantidad de luz dispersada a 360 nm. La malato deshidrogenasa (700 nM) fue calentada a 43°C en la ausencia de SHSP16 (□); en la presencia de una tasa molar 1:1 de SHSP16 (Δ); o en la presencia de BSA (1:1) (○). La agregación térmica de MDH fue prevenida por la adición de SHSP16. Los datos son representativos de 3-5 experimentos independientes y se muestran como el promedio \pm SD.

7.2.10. Modelamiento de SHSP16

Se realizó la predicción de la estructura tridimensional de SHSP16 de *T. cruzi* utilizando el servidor SWISS-MODEL, basado en la técnica de modelamiento comparativo que usa como plantados estructuras resueltas emparentadas ya reportadas. El modelo generado se muestra en la Figura 7.20, el cual es una representación en cintas del monómero de SHSP16 editado con los programas PPG: the Protein Picture Generator y DINO: Visualizing Structural Biology (2002). Las hojas β de SHSP16 se numeran en el modelo, al igual que en el alineamiento de la Figura 7.12, a partir de las hojas correspondientes en la estructura de HSP16.9. Debido a que con los programas anteriores la estructura terciaria no puede ser visualizada de la misma manera que cuando se utilizó el programa Swiss-PDB Viewer mostrada en la Figura 7.20B, las

cadena β faltantes en la Figura 7.20A fueron señaladas entre comillas y las α -hélices sobrantes no fueron marcadas. A pesar de la baja identidad entre la secuencia de *T. cruzi* con la HSP16.9 de trigo (25%), la estructura del monómero es muy parecida entre las dos, como se puede observar en la imagen conteniendo los modelos superpuestos (Figura 7.20B).

A)



B)

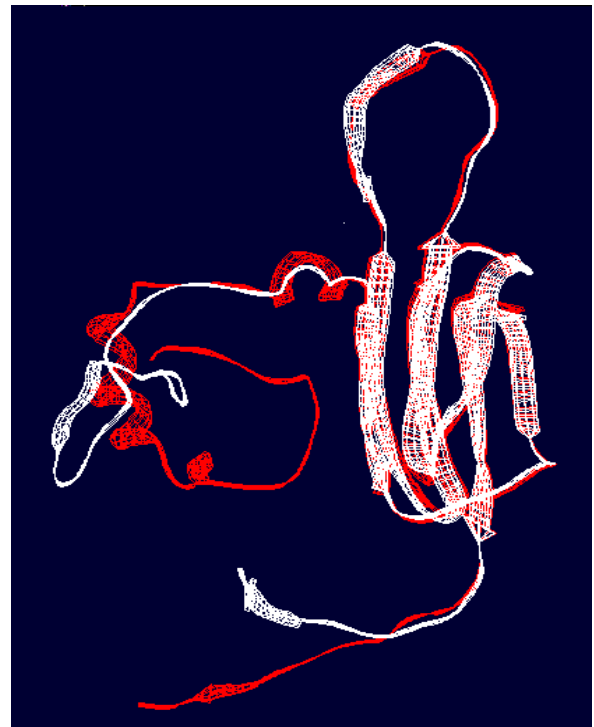


Figura 7.20. Modelo 3D de SHSP16 de *T. cruzi*. A) Modelo en cintas de un monómero de SHSP16 con las colas azarosas mostradas en amarillo, α -hélices en azul y hojas β en rojo. Las hojas β fueron enumeradas a partir de las hojas correspondientes en HSP16.9 (ver Figura 7.12). La orientación de las hojas β está indicada por las cabezas de las flechas dirigiéndose al extremo C-terminal. Los extremos N- y C- terminal están indicados como N y C, respectivamente. B) Superposición de los monómeros de HSP16.9 de trigo (rojo) y SHSP16 de *T. cruzi* (blanco). Los extremos N- y C- terminal están señalados.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.I. ANÁLISIS PROTEÓMICO

La mayor parte de los trabajos dirigidos al estudio de la expresión diferencial de genes en *T. cruzi* se han enfocado a la determinación de los niveles de mRNA. Sin embargo, en *T. cruzi*, al igual que en otros organismos, se ha observado una pobre correlación entre el nivel de mRNA y el nivel de proteínas. Los genes en los tripanosomas están organizados en grandes unidades de transcripción policistrónicas (varios genes son transcritos por un solo mRNA), por lo que la regulación genética está encaminada generalmente al control de la estabilidad y/o a la traducción de mRNAs específicos. Adicionalmente, las modificaciones post-traduccionales juegan un papel muy importante en modular la función de las proteínas (Parodi-Talice *et al.*, 2004). Por lo anterior, es deseable un análisis proteómico para estudiar los niveles de expresión de proteínas cuando el parásito es expuesto a distintas condiciones, entre ellas el estrés.

En el presente trabajo se decidió utilizar la técnica de tinción con nitrato de plata para el análisis de los geles bidimensionales debido a que la expresión diferencial de proteínas en respuesta a algunos tipos de estrés incluido el calórico y otras condiciones fisiológicas de crecimiento, se ha estudiado en distintos organismos a través de la misma técnica de tinción de geles de doble dimensión y cuyos resultados se han publicado recientemente en revistas internacionales reconocidas, tanto especializadas en el área proteómica, como no especializadas (Baars *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006; Paba *et al.*, 2004). No obstante, existe una polémica sobre la eficacia de emplear geles teñidos con nitrato de plata para estudiar la expresión diferencial de proteínas, por lo que se sugiere realizar una tinción de los geles con azul de Coomassie para confirmar o validar los datos. Por lo tanto, el análisis presentado en este trabajo es considerado como preliminar en vista de los argumentos anteriores.

En *T. cruzi*, la respuesta al estrés calórico ha sido estudiada al nivel de la expresión diferencial de proteínas del grupo de las HSPs (de Carvalho *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 1994; Requena *et al.*, 1992), mientras que la identidad de otras proteínas no se ha reportado. Sin embargo, debido a la variabilidad de alteraciones que sufren las células en condiciones de estrés calórico, es de esperarse que

una cantidad de proteínas con una amplia variedad de funciones sean expresadas y que la respuesta al choque térmico no se limite a la producción de chaperonas.

8.1.1. Inducción de la respuesta de estrés calórico en epimastigotes

El estudio de la respuesta de estrés calórico no letal en *T. cruzi* ha sido abordado a distintas temperaturas de crecimiento, que van desde 37°C hasta 43°C, constituyendo una gama de condiciones de estrés calórico que pueden ser bajas, moderadas o extremas (Olson *et al.*, 1994). Por otro lado, el tipo de respuesta mostrada en las distintas temperaturas varía y depende de la cepa estudiada. En un estudio, parásitos de la cepa Maracay expuestos a 42°C durante 4 horas adquirieron una forma redonda (Requena *et al.*, 1992), mientras que parásitos de la clona Silvio X-10/4 incubados a la misma temperatura durante 3 horas, no experimentaron dicha transformación (Olson *et al.*, 1994).

En 1994, de Carvalho *et al.* determinaron que la cepa CL de *T. cruzi* no mostró una respuesta clásica de estrés a 37°C. En otro estudio se demostró que el nivel máximo de expresión de una de las principales moléculas inducidas en la respuesta de estrés calórico en muchos organismos, a saber HSP70, ocurrió sólo tras la incubación de epimastigotes de *T. cruzi* a 42°C durante 3 horas y no a 37°C o 40°C durante el mismo periodo de tiempo (Olson *et al.*, 1994). Así, con base en los reportes anteriores y a los resultados de la curva de inhibición de la movilidad de la Figura 7.1, donde se observa que a 37°C los parásitos mostraron un porcentaje de movilidad igual al de la condición control, sugiriendo un efecto mínimo de la temperatura sobre la movilidad, se decidió usar la temperatura de 42°C para inducir la respuesta de estrés calórico en *T. cruzi*. Además, el tiempo de exposición fue de 3 horas, tiempo en el cual el porcentaje de movilidad fue de ~75%. A pesar de que la temperatura de 42°C no es una temperatura fisiológica encontrada generalmente en los humanos, sí lo puede llegar a ser en otros organismos hospederos del parásito (Escobar y Amezcua, 1981).

8.1.2. Proteoma de *T. cruzi* en condiciones de estrés calórico

En los geles bidimensionales, el número de proteínas detectadas es comparable y aún mayor al reportado previamente por Parodi-Talice *et al.* en 2004, donde utilizando extractos proteicos de epimastigotes en un rango de pH idéntico y en un gel de

poliacrilamida al 10%, encontraron un promedio de 350 puntos. Adicionalmente, como previamente se reportó por los mismos autores, la mayoría de las proteínas se localizaron en la región ácida y consecuentemente, la resolución en la separación de las proteínas fue menor en dicha región del gel que en la zona básica (Figura 7.2). Restringir el rango de pH, así como utilizar diferentes concentraciones de acrilamida en estudios futuros permitirá obtener un perfil proteómico quizá todavía más rico y con mayor resolución, en especial en la zona ácida al encontrado aquí.

8.1.3. Identificación de proteínas por huella peptídica

Como se advierte en las Tablas 7.1 y 7.2, para la gran mayoría de las proteínas identificadas hubo una buena correlación entre la MM y el pI teórico y experimental. El puntaje (Mowse score) es una de las medidas convencionales de validación de los péptidos y proteínas identificadas por MS que refleja el alineamiento entre las masas determinadas teórica y experimentalmente, por lo que, generalmente, la proteína identificada como la más probable será aquella cuyo puntaje sea el más alto, ya que un puntaje alto sugiere la existencia de una probabilidad baja de que el alineamiento de los péptidos teóricos y experimentales haya sido azaroso (Pappin, 1993). El porcentaje de cobertura se refiere a los fragmentos de la secuencia de la proteína candidata que alinearon con las señales iónicas de los péptidos generados por el espectrómetro de masas.

Así, las 24 proteínas identificadas como las más probables mostraron una variabilidad de funciones y en su mayoría pertenecieron a alguno de los grupos funcionales de proteínas descritas a ser inducidas en la mayoría de los organismos donde se ha estudiado la respuesta al estrés calórico. De las proteínas identificadas en *T. cruzi* a las cuales se les asignó una probable función, sólo las proteínas de superficie no tuvieron una equivalencia con lo reportado para otros organismos. Se ha propuesto que mientras que algunos mecanismos de respuesta al estrés están muy conservados entre todas las especies, quizá otros, como los involucrados en la optimización del metabolismo y función celular o la regulación, podrían variar de organismo en organismo (Slabas *et al.*, 2006).

8.1.3.1. Proteínas de respuesta al estrés y degradación

Comprenden el grupo más representado de las proteínas identificadas, lo cual era de esperarse debido a que el proteoma analizado fue derivado de parásitos sometidos a estrés calórico. Se encontraron enzimas involucradas en el funcionamiento del proteosoma. En células eucariontes, la mayor parte de las proteínas en el núcleo y citoplasma son degradadas, no en los lisosomas, sino en el proteosoma 26S, un complejo multisubunidad localizado en el citoplasma y compartimentos nucleares. La vía proteolítica del proteosoma controla una amplia variedad de funciones celulares entre las que se encuentran el control de calidad de proteínas, que dirige la degradación de proteínas mutadas o dañadas (de Diego *et al.*, 2001). En *T. cruzi*, se ha documentado el papel esencial que el proteosoma tiene en la transformación a los distintos estadios del parásito (González *et al.*, 1996).

HSP70 y su co-chaperona HSP40 (chaperona DnaJ) también incrementaron su densidad en condiciones de estrés calórico. El aumento en número de veces con respecto al control de HSP70 (1.95) fue similar al previamente determinado en las mismas condiciones de estrés calórico por Olson *et al.* en 1994, donde encontraron un aumento de 2.5 veces.

Otras dos proteínas, tiol transferasa y triparedoxina peroxidasa, involucradas en contrarrestar el estrés oxidativo (Sies, 1993; Krauth-Siegel *et al.*, 2003), están entre las proteínas identificadas. Se ha reportado que tras un choque térmico, se genera una respuesta de estrés oxidativo, lo cual puede explicarse por varias razones. Al haber un estrés calórico, muchas proteínas son desnaturalizadas, entre ellas proteínas antioxidantes, las cuales, al estar inactivas llevan a la acumulación de especies reactivas de oxígeno características del metabolismo aerobio, además, se ha demostrado que la reactividad del superóxido incrementa con el calor. De esta forma, se crea un estrés oxidativo, por lo que los organismos expuestos a estrés calórico tienen que hacer uso también de las proteínas que los protejan del daño oxidativo (Davidson *et al.*, 1996; Sies, 1993).

8.1.3.2. Metabolismo

Entre las proteínas involucradas en la generación de energía se encontraron ATPasas. Otras enzimas encontradas implicadas en procesos generadores de energía como sería el catabolismo de aminoácidos, fueron la glutamato deshidrogenasa y la

hidroxiacil- α -L-aromática deshidrogenasa, involucrada en el catabolismo de aminoácidos aromáticos (Nowicki y Cazzulo, 2007). También se encontró a la deshidrogenasa dependiente de NAD/FAD, involucrada en la fosforilación oxidativa.

8.1.3.3. Traducción de proteínas

Se encontró a la cisteinil-tRNA sintetasa como la proteína más fuertemente incrementada. La síntesis aumentada de HSPs y otras proteínas se requiere en condiciones de choque térmico (Slabas *et al.*, 2006). Para que pueda llevarse a cabo el inicio de la traducción de proteínas, es necesaria la activación de los aminoácidos a través de la enzima aminoacil-tRNA-sintetasa y cuyo nombre cambia de acuerdo al aminoácido al que se une (Lewin, 1998).

Los tres grupos funcionales de proteínas anteriores son inducidos en todos los organismos en los que la respuesta al estrés calórico se ha estudiado globalmente (Lee *et al.*, 2006; Mádi *et al.*, 2003; Majoul *et al.*, 2004; Schmid *et al.*, 2005; Slabas *et al.*, 2006).

8.1.3.4. Transporte intracelular

Este grupo de proteínas estuvo representado por la proteína activadora de GTPasa (guanina trifosfatasa) Rab6, la cual está involucrada en la regulación del transporte de membrana (Berriman *et al.*, 2005).

8.1.3.5. Proteínas de superficie

Interesantemente, algunas proteínas fueron identificadas como de superficie. Entre estas proteínas se encontraron proteínas de superficie asociadas a mucina (MASPs), las cuales son proteínas específicas de *T. cruzi* de las que se desconoce su función (El-Sayed *et al.*, 2005b) e hipotéticamente están mayormente representadas en el estadio de tripomastigotes, sugiriendo por lo tanto, un papel en la infectividad (Atwood *et al.*, 2005). También se identificó una mucina, la glucoproteína de superficie Tc-85/16, así como la metaloproteasa de superficie gp63, la cual se ha implicado en la virulencia, infección de la célula hospedera y en la liberación de proteínas de superficie del parásito (El-Sayed *et al.*, 2005b).

El encuentro de proteínas de superficie del parásito con una mayor densidad entre la condición estresada respecto al control es algo inesperado debido a que en *T. cruzi* la diferenciación de un estadio a otro no está directamente asociada con la temperatura (Graefe *et al.*, 2002), como sería el caso para *Leishmania*, donde un incremento en la temperatura lleva a la diferenciación de los parásitos a las formas infectivas (Zilberstein y Shapira, 1994). Debido a que las proteínas de superficie están sobre todo involucradas en la infección y virulencia, su presencia en epimastigotes es un tanto sorprendente. Quizá el estrés calórico, usado como modelo de estrés ambiental, induzca una señal de “pre-diferenciación” molecular de epimastigotes a tripomastigotes no detectable morfológicamente o quizá la repuesta de estrés calórico genere un patrón de expresión de proteínas muy similar al mostrado en la diferenciación a tripomastigotes, como fue sugerido por Alcina *et al.* en 1988. Para el caso de proteínas de superficie con una menor densidad en el control con respecto al estresado a 42°C, quizá sugiera un recambio de las moléculas que al ser de superficie, funcionan como receptoras o antígenos. Para bacterias, se ha propuesto que la síntesis de factores de virulencia está influenciada por la disponibilidad de nutrientes, el pH, la fase de crecimiento y la temperatura (Lee *et al.*, 2006).

8.1.3.6. Proteínas hipotéticas y otras proteínas

Se encontraron 4 proteínas hipotéticas, de las cuales sería interesante establecer si son específicas de *T. cruzi*.

Una proteína retrotransposón hot-spot fue encontrada, la cual está asociada con regiones subteloméricas polimórficas (El-Sayed *et al.*, 2005b) y cuya función en estrés calórico no pudo ser determinada.

VIII.II. ANÁLISIS MOLECULAR

En *T. cruzi*, diversos trabajos han caracterizado genética y bioquímicamente proteínas de estrés calórico de pesos moleculares altos como HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90 (Dragon *et al.*, 1987; Fernandes *et al.*, 2005; Giambiagi-de Marval *et al.*, 1993; Giambiagi-de Marval *et al.*, 1996; Olson *et al.*, 1994; Requena *et al.*, 1988; Tibbetts *et al.*, 1998). Sin embargo, nada había sido descrito sobre las sHSPs, por lo que, hasta lo que se conoce, el resultado de este estudio describe por primera vez la identificación, clonación y expresión de un miembro de la familia de α -HSPs identificado en el parásito *T. cruzi* y por primera vez también en el grupo de los Tripanosomátidos.

8.2.1. Identificación del gen *SHSP16*

Durante el curso de la realización del presente trabajo, en la base de datos preliminar del genoma de *T. cruzi* (<http://TcruziDB.org>), la proteína caracterizada aquí, así como su secuencia codificadora fueron clasificados como gen y proteína de choque térmico putativos (nombrada HSP20), sin ninguna información adicional. Aquí, basados en el análisis de secuencia, además de los experimentos de expresión y actividad *in vitro* de la proteína, ratificamos e incluimos a la proteína en la familia de α -HSPs y de acuerdo a su aparente masa molecular la denominamos SHSP16.

A diferencia de lo que ocurre con otras proteínas de estrés calórico como son las familias HSP60 y HSP70, las cuales están altamente conservadas a lo largo de la escala filogenética (Lindquist y Craig, 1988; Plesofsky-Vig *et al.*, 1992; Waters *et al.*, 1996), las α -HSPs a pesar de estar relacionadas, presentan en general una baja identidad de secuencia entre ellas y una alta identidad está limitada únicamente al dominio α -cristalino (de Jong *et al.*, 1998). Y fue precisamente debido a esta región conservada que la búsqueda heteróloga fue eficiente, arrojando una secuencia de 109 aminoácidos que ahora sabemos correspondía al dominio α -cristalino. En dicho análisis, no se encontró otra secuencia con una similitud aproximada a la determinada, por lo que la existencia de un sólo gen que codifique para una α -HSP en el genoma de *T. cruzi* es probable, lo cual es consistente con el hecho de que organismos eucariontes unicelulares típicamente poseen de 1-2 genes que codifican para α -HSPs (Haslbeck *et al.*, 2005). Por otro lado, si en *T. cruzi* existen proteínas relacionadas, quizá éstas hayan divergido

considerablemente hasta el punto de no mostrar una similitud de secuencia detectable. Adicionalmente, aunque en los tripanosomátidos un arreglo de los genes en tándem es típico (El-Sayed *et al.*, 2005a), para *SHSP16* no parece ser el caso.

8.2.2. Análisis de la secuencia nucleotídica

Al analizar la secuencia de nucleótidos de *SHSP16* de las tres cepas mexicanas y las de los dos haplotipos de CL-Brener, se detectaron polimorfismos en las secuencias, los cuales agruparon a las cepas de acuerdo a su grupo genético (Tabla 7.3).

Para *T. cruzi* ya se ha reportado que cambios en la secuencia nucleotídica de distintas regiones del genoma correlacionan con los dos linajes principales en los que se agrupa al parásito, tanto en secuencias codificantes, como en no codificantes (Dos Santos y Buck, 1999; Machado y Ayala, 2002; Souto *et al.*, 1996; Sturm *et al.*, 2003). En regiones codificantes, la tasa de variación de nucleótidos más pequeña utilizada para dividir a *T. cruzi* en sus dos grupos genéticos principales es de 0.7% para el gen de la topoisomerasa II (Dos Santos y Buck, 1999), la cual es prácticamente igual a la encontrada en *T. cruzi SHSP16*, la cual fue de 0.69%.

Resulta de interés considerar aumentar el número de cepas estudiadas con el fin de determinar si basados en el polimorfismo del gen *SHSP16*, la división entre los dos grupos genéticos de *T. cruzi* se conserva, en cuyo caso este gen podría ser usado como otro marcador genético que separe a las cepas de *T. cruzi* en sus dos grupos genéticos principales.

En cuanto a cambios en los aminoácidos derivados de los polimorfismos presentes en el gen *SHSP16*, el único cambio presente corresponde al de una asparagina por una serina, los cuales son ambos residuos de aminoácidos hidrofílicos neutros, por lo que, debido a la conservación en su naturaleza química, muy probablemente no impliquen un cambio importante en la actividad de las proteínas resultantes.

8.2.3. Análisis de la secuencia de aminoácidos

En el alineamiento de *SHSP16* con secuencias homólogas de otros organismos, la mayor identidad se presentó con la secuencia de *T. brucei* (55.6 %) (Figura 7.12), lo cual es congruente con el mayor parentesco que tiene *T. cruzi* con dicho parásito. El porcentaje de identidad entre las proteínas aumentó al alinear únicamente su dominio α -

cristalino (Tabla 7.4), lo cual era de esperarse, pues al ser ésta la región más conservada de las secuencias de α -HSPs, es donde se comparte una mayor similitud entre todas las secuencias analizadas, no así para los extremos amino y carboxilo terminales (de Jong *et al.*, 1998).

Los motivos de secuencia conservados generales encontrados en las α -HSPs alineadas son señales típicas encontradas en la gran mayoría de las sHSPs analizadas (de Jong *et al.*, 1998; Plesofsky-Vig *et al.*, 1992; Studer *et al.*, 2002). Asimismo, el análisis señaló la presencia de motivos de secuencia conservados únicamente entre el grupo de las α -HSPs no animales multicelulares, que no están presentes en las secuencias de humano ni de plantas, como ya se había reportado previamente (de Jong *et al.*, 1998), y de los cuales, sólo de algunos se ha estudiado su papel estructural y funcional (Fu and Chang, 2006; Studer *et al.*, 2002). Alineamientos utilizando un grupo de secuencias más grande de un determinado grupo de organismos, como sería el caso de protozoarios que causan enfermedades en el hombre, entre ellos los cinetoplástidos, podría revelar un número mayor de motivos característicos que fueran distinguibles de las secuencias de humano, los que podrían ser estudiados para determinar si son relevantes en la supervivencia del parásito y si es el caso, ser utilizados como blancos terapéuticos.

Por otra parte, la naturaleza conservada de los residuos de cisteína en el grupo de los cinetoplástidos es de llamar la atención porque se ha determinado que el porcentaje de ocurrencia de cisteínas en la mayoría de las chaperonas estudiadas va de 0%-1%, pues se ha propuesto que dichos residuos han sido eliminados durante la evolución debido a que al tener la capacidad de formar enlaces disulfuro, reducirían la flexibilidad conformacional y capacidad de auto-renaturalizarse y ensamblarse de las α -HSPs, además de reducir la capacidad de formar uniones específicas con las proteínas blanco (Fu *et al.*, 2003). Por lo anterior, resulta interesante el estudiar el posible papel funcional de las cisteínas conservadas en el grupo de los cinetoplástidos.

Asimismo, al aumentar el número de secuencias, los análisis filogenéticos podrán ser renovados y proveer más información sobre la historia evolutiva de esta familia de proteínas en este particularmente importante grupo de organismos parásitos.

El análisis de la estructura secundaria es congruente con lo reportado, donde las sHSPs son ricas en hojas β -plegadas (de Jong *et al.*, 1998).

8.2.4. Expresión del mRNA y de la proteína SHSP16 en estrés calórico

Análisis de RT-PCR revelaron que el mRNA de *SHSP16* se expresa constitutivamente en epimastigotes de *T. cruzi* y que su transcripción se induce tras el tratamiento de estrés calórico (Figura 7.13). Un incremento en la expresión de genes de α -HSPs ha sido reportada en muchas condiciones de estrés incluyendo estrés calórico, estrés oxidativo, estrés ácido, estrés por frío y toxicidad química (González-Márquez *et al.*, 1997; Reineke, 2005; Rogalla *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2005), por lo que sería interesante analizar la regulación de la expresión del gen de *T. cruzi* en otras condiciones de estrés. Además, también se ha determinado que la expresión de α -HSPs es diferencial en los distintos estadios de desarrollo de algunos parásitos (de Miguel *et al.*, 2005) lo cual podría ser relevante de estudiar para *T. cruzi*, así como su localización subcelular, con el fin de poder establecer hipótesis sobre su posible función.

El bajo nivel de inducción de SHSP16 en condiciones de estrés calórico fue algo inesperado de encontrar (Figura 7.18), ya que se ha reportado que estas proteínas están entre las más fuertemente inducidas en condiciones de estrés en otros organismos (Haslbeck, 2002), aunque para el caso de los tripanosomátidos, no existe ninguna información con la cual comparar. Lo anterior puede ser debido a que quizá *T. cruzi*, al estar expuesto constantemente a distintos tipos de estrés, haya conservado con el tiempo un nivel basal más alto de esta proteína con el fin de tenerla disponible en caso de someterse a algún tipo de estrés y por eso la inducción no sea tan evidente. La otra explicación es que el nivel de inducción observado sea suficiente o que la inducción de esta proteína esté más involucrada en otros procesos celulares como sería la diferenciación, por lo que será interesante determinar si en los otros estadios, SHSP16 está presente y si lo está, en qué concentraciones. Asimismo, quizá el tiempo de inducción no fue el suficiente.

8.2.5. Oligómeros de SHSP16

Una característica distintiva de las α -HSPs es su oligomerización en complejos de mayor tamaño (Sun y MacRae, 2005). El análisis de Western blot sugiere la presencia de multimeros (Figura 7.17), pero si éstos se forman de manera nativa o fueron inducidos en la preparación de la muestra tendrá que ser determinado en el futuro. *In vitro*, el monómero parece no formar éstos agregados.

Por otro lado, las cisteínas presentes en la secuencia de SHSP16 parecen no formar puentes disulfuro inter-subunidad, pues ningún dímero fue observado en condiciones no reductoras (Figura 7.15, línea 7). En una α -HSP de *Taenia solium* (Tsp36) se describió que el único residuo de cisteína presente en la secuencia participa en la estabilización del tetrámero formado (Kappé *et al.*, 2004). Si las dos cisteínas presentes en SHSP16 de alguna forma contribuyen a la estabilidad de los complejos de la proteína lo desconocemos.

8.2.6. Actividad de chaperona *in vitro* de SHSP16

La actividad *in vitro* de SHSP16 fue evaluada a través del ensayo de agregación térmica de MDH, previamente usada como sustrato para el estudio de la actividad de chaperona de distintas α -HSPs (Basha *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1997) (Figura 7.19). La efectividad de chaperona mostrada por SHSP16 es mayor a la efectividad mostrada por otras dos α -HSPs presentes en trigo, la HSP16.9, la cual inhibió la agregación de la enzima MDH casi por completo a una tasa molar de 3:1 (SHSP:MDH), y la HSP17.8, que lo hizo a una tasa molar de 5:1 (Basha *et al.*, 2004), sugiriendo que SHSP16 posee una buena actividad de chaperona, aunque no mayor a la HSP18.1 de chícharo, la cual sólo necesita una tasa molar de 0.33:1 para inhibir la agregación de MDH por completo (Lee *et al.*, 1997).

8.2.7. Modelamiento de SHSP16

La única estructura cristalizada disponible hasta el momento para una α -HSP eucarionte corresponde a la HSP16.9 de trigo (van Montfort *et al.*, 2001), la cual permite una comparación estructural con SHSP16 de *T. cruzi*, dentro del contexto de proteínas pertenecientes a dos grupos de organismos no emparentados cercanamente. En las dos proteínas, los dominios α -cristalino son muy similares y en ambas están conformados por dos hojas β antiparalelas organizadas en β -sandwich de donde sale un asa grande. En HSP16.9 el asa que sobresale es el asa de dimerización, involucrada en la interacción de los dos monómeros a través de la cadena β_6 para la formación del dímero, el cual es el bloque de construcción del oligómero, éste último generado en la interacción cuaternaria. Similar al modelo de trigo, el asa que sobresale del dominio α -

cristalino en SHSP16 es grande y contiene una cadena β de mayor tamaño que la de HSP16.9. Después de la estructura β -sandwich, hay una corta extensión carboxilo terminal. En el caso del extremo amino terminal, el de SHSP16 es de menor longitud en comparación con el de HSP16.9 (Figura 7.20B). La otra estructura de α -HSPs resuelta a nivel atómico es la perteneciente a HSP16.5 de *M. jannaschii* (Kim *et al.*, 1998), con la cual también se comparó la estructura de SHSP16 de *T. cruzi*, mostrando que el monómero de SHSP16 es más parecido al de HSP16.9 de trigo, lo cual concuerda con la naturaleza eucarionte de los dos últimos organismos.

Por otro lado, la naturaleza conservada en las secuencias de los cinetoplástidos de los residuos de cisteína (posiciones 122 y 155 del alineamiento de la Figura 7.12) fue explorada en el modelo 3D. Mientras una de las cisteínas se encuentra en la cadena β 5 (posición 122), la otra se ubica en la cadena β 7 (posición 155), que al ser alineadas con la secuencia de trigo, en ésta última corresponden a una valina (V) y una arginina (R), respectivamente (Figura 7.12). Con el fin de determinar de qué forma pudieran estar interactuando las cisteínas, consideramos los enlaces que presentan los residuos correspondientes en la estructura de HSP16.9 (van Montfort *et al.*, 2001). Si las cisteínas de SHSP16 interactuaran de manera similar a como lo hacen los residuos correspondientes en HSP16.9, la formación de un dímero a través de un enlace disulfuro entre éstas sería improbable, ya que a pesar de que las cadenas β 5 y β 7 se encuentran localizadas cercanamente, los aminoácidos de la cadena β 7 interactúan con el extremo amino terminal en la formación del dímero y la R (posición 155) forma un enlace con una S de otro monómero (posición 29 del alineamiento, Figura 7.12), situada en una región consenso característica de α -HSPs de plantas y mamíferos (Plesofsky-Vig *et al.*, 1992; van Montfort *et al.*, 2001). No obstante, el análisis con el programa Swiss-PDB Viewer muestra una cercanía de menos de 6 Å entre las dos cisteínas, los cuales son necesarios para la formación de un enlace disulfuro (Perry y Wetzel, 1984). La explicación anterior para la aparente ausencia de enlaces disulfuro en SHSP16 es una mera suposición, pues debido a la variabilidad en secuencia presente en el extremo amino terminal de las α -HSPs, se ha sugerido que dicha región está involucrada en la interacción de los monómeros que llevan a la formación de los oligómeros (Sun y MacRae, 2005), por lo que las diferentes α -HSPs pueden tener una interacción en aminoácidos distintos que lleven al arreglo espacial específico.

Finalmente, el presente trabajo constituye el primer estudio preliminar en el que la respuesta al estrés calórico en *T. cruzi* es estudiado globalmente, con la identificación de otras proteínas, diferentes a las HSPs de pesos moleculares altos, que posiblemente están involucradas en dicha respuesta. Por otra parte, la caracterización del gen *SHSP16* constituye el reporte de la primer α -HSP identificada y parcialmente caracterizada en *T. cruzi*. Dados los resultados obtenidos, es de nuestro interés iniciar un análisis más profundo sobre la posible función de esta molécula en el parásito.

IX. CONCLUSIONES

- ❖ Se identificó un grupo de proteínas que muy posiblemente están involucradas en la respuesta al estrés calórico en *T. cruzi*, la mayoría de las cuales no había sido anteriormente relacionada a participar en dicha respuesta en el parásito.
- ❖ Se identificó y clonó la secuencia de DNA de un gen que codifica para una proteína del grupo de las α -HSPs en *T. cruzi*, nombrándolo *SHSP16*.
- ❖ La secuencia nucleotídica del gen *SHSP16* separó a las cepas de *T. cruzi* en sus dos grupos genéticos principales.
- ❖ El gen *SHSP16* presentó una inducción a nivel transcripcional y traduccional en condiciones de estrés calórico.
- ❖ La proteína SHSP16 presenta actividad de chaperona molecular *in vitro*.

X. PERSPECTIVAS

- ❖ Confirmar los datos obtenidos en el análisis proteómico mediante la tinción de los geles con azul de Coomassie.
- ❖ Investigar la localización subcelular de SHSP16 en *T. cruzi*.
- ❖ Analizar la expresión de SHSP16 en otras condiciones de estrés.
- ❖ Determinar la expresión de SHSP16 en los distintos estadios de desarrollo de *T. cruzi*.
- ❖ Generar mutantes nulas del gen SHSP16 con el fin de establecer la posible función biológica en los parásitos.

XI. REFERENCIAS

1. **Alcina A., A. Urzainqui, L. Carrasco.** 1988. The heat-shock response in *Trypanosoma cruzi*. Eur. J. Biochem. **172**: 121-127.
2. **Alcina A., M. Fresno.** 1988. Early and late heat-induced proteins during *Leishmania mexicana* transformation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **156**: 1360-1367.
3. **Atwood J. A., D. B. Weatherly, T. A. Minning, B. Bundy, C. Cavola, F. R. Opperdoes, R. Orlando, R. L. Tarleton.** 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science **309**: 473-476.
4. **Baars L., A. J. Ytterberg, D. Drew, S. Wagner, C. Thilo, K. J. van Wijk, J. de Gier.** 2006. Defining the role of the *Escherichia coli* chaperone SecB using comparative proteomics. J. Biol. Chem. **281**: 10024-10034.
5. **Basha E., G. J. Lee, B. Demeler, E. Vierling.** 2004. Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. Eur. J. Biochem. **271**: 1426-1436.
6. **Bateman A., E. Birney, R. Durbin, S. R. Eddy, K. L. Howe, E. L. Sonnhammer.** 2000. The Pfam Protein Families Database. Nucleic Acids Res. **28**: 263-266.
7. **Berkelman T., T. Stenstedt.** 1998. 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc.
8. **Berriman M. et al.** 2005. The genome of the african trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science **309**: 416-422.
9. **Bosseno M. F., C. Barnabé, E. Magallón Gastélum, F. Lozano Kasten, J. Ramsey, B. Espinoza, S. F. Brenieré.** 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in México. J. Clin. Microbiol. **40**: 627-632.
10. **Brener Z.** 1992. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. En: Wendel S., Z. Brener, M. E. Camargo, A. Rassi (Ed.), Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil'92. Sao Paulo.
11. **Caballero Franco Celia.** 2002. Caracterización de una proteína de estrés de 16 kDa (HSP16) de *Entamoeba histolytica*. Tesis de Licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México.

12. **Causton H. C., B. Ren, S. S. Koh, C. T. Harbison, E. Kanin, E. G. Jennings, T. I. Lee, H. L. True, E. S. Lander, R. A. Young.** 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **12**: 323-337.
13. **Cevallos A. M., M. Pérez-Escobar, N. Espinosa, J. Herrera, I. López-Villaseñor, R. Hernández.** 2005. The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**: 259-264.
14. **Cevallos A. M., R. Hernández.** 2001. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). *En*: Martínez Romero E. y J. Martínez (Ed.), *Microbios en línea* (<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap15>).
15. **Chiari E., E. P. Camargo.** 1984. Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*. *En*: M. Morel (Ed.), *Genes and Antigens of Parasite*. Institute Oswaldo Cruz, Río de Janeiro.
16. **Clayton C. et al.** 1998. Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **97**: 221-224.
17. **Davidson J. F., B. Whyte, P. H. Bissinger, R. H. Schiestl.** 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5116-5121.
18. **de Carvalho E. F., F. T. de Castro, E. Rondinelli, C. M. Soares, J. F. Carvalho.** 1990. HSP 70 gene expression in *Trypanosoma cruzi* is regulated at different levels. *J. Cell. Physiol.* **143**: 439– 444.
19. **de Carvalho E. F., F. T. de Castro, E. Rondinelli, J. F. Carvalho.** 1994. Physiological aspects of *Trypanosoma cruzi* gene regulation during heat-shock. *Biol. Res.* **27**: 225-231.
20. **de Diego J. L., J. M. Katz, P. Marshall, B. Gutiérrez, J. E. Manning, V. Nussenzweig, J. González.** 2001. The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry* **40**: 1053–1062.
21. **de Jong W. W., G. J. Caspers, J. A. M. Leunissen.** 1998. Genealogy of the alpha-crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.* **22**: 151–162.
22. **de Miguel N., P. C. Echeverria, S. O. Angel.** 2005. Differential subcellular localization of members of the *Toxoplasma gondii* small heat shock protein family. *Eukaryot. Cell* **4**: 1990-1997.

23. **De Souza W.** 2002a. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 269-285.
24. **De Souza W.** 2002b. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **1**: 3.
25. **Dias J. C. P.** 1992. Epidemiology of Chagas disease. *En*: Wendel S., Z. Brener, M. E. Camargo, A. Rassi (Ed.), Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil'92. Sao Paulo.
26. **Dos Santos W. G., G. A. Buck.** 1999. Polymorphisms at the topoisomerase II gene locus provide more evidence for the partition of *Trypanosoma cruzi* into two major groups. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**: 17-23.
27. **Dragon E. A., S. R. Sias, E. A. Kato J. D. Gabe.** 1987. The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1271-1275.
28. **Durante de Isola E., S. González Cappa.** 1994. Vectores transmisores: triatomíneos, "vinchucas". *En*: Storino R. y J. Milei (Ed.), Enfermedad de Chagas. Mosby Doyma Argentina. Buenos Aires.
29. **El-Sayed N. M. et al.** 2005a. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* **309**: 404-409.
30. **El-Sayed N. M. et al.** 2005b. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**: 409-415.
31. **Escobar A., M. E. Amezcua.** 1981. El armadillo: un nuevo animal de experimentación para el estudio de las zoonosis. *Ciencia Veterinaria* **3**: 199-229.
32. **Espinoza B., J. M. Vera-Cruz, H. González, E. Ortega, R. Hernández.** 1998. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Trop.* **15**: 63-72.
33. **Feder M. E.** 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**: 243-82.
34. **Fernandes M., R. Silva, S. C. Rössle, P. M. Bisch, E. Rondinelli, T. P. Ürményi.** 2005. Gene characterization and predicted protein structure of the mitochondrial chaperonin HSP10 of *Trypanosoma cruzi*. *Gene* **349**: 135-142.
35. **Ferrer E., L. M. González, M. Foster-Cuevas, M. M. Cortéz, I. Dávila, M. Rodríguez, E. Sciutto, I. J. S. Harrison, R. M. E. Parkhouse, T. Gárate.** 2005.

- Taenia solium*: characterization of a small heat shock protein (Tsol-sHSP35.6) and its possible relevance to the diagnosis and pathogenesis of neurocysticercosis. *Exp. Parasitol.* **110**: 1-11.
36. **Finzi J. K, C. W. M. Chiavegatto, K. F. Corat, J. A. López, O. G. Cabrera, A. A. Mielniczki-Pereira, W. Colli, M. J. M. Alves, F. R. Gadelha.** 2004. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol. Biochem. Parasitol.* **133**: 37-43.
37. **Fu X., W. Li, Q. Mao, Z. Chang.** 2003. Disulfide bonds convert small heat shock protein Hsp16.3 from a chaperone to a non-chaperone: implications for the evolution of cysteine in molecular chaperones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**: 627-635.
38. **Fu X., Z. Chang.** 2006. Identification of a highly conserved Pro-Gly doublet in non-animal small heat shock proteins and characterization of its structural and functional roles in *Mycobacterium tuberculosis* Hsp16.3. *Biochemistry (Moscow)* **71** (Suppl. 1): S83-S90.
39. **Giambiagi-de Marval M., K. Gottesdiener, E. Rondinelli, L. H. T. Van Der Ploeg.** 1993. Predicted amino acid sequence and genomic organization of *Trypanosoma cruzi* hsp 60 genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 25–32.
40. **Giambiagi-de Marval M., T. Souto-Padrón, E. Rondinelli.** 1996. Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **83**: 335-345.
41. **González Cappa S., E. Durante de Isola.** 1994. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. *En: Storino R. y J. Milei (Ed.), Enfermedad de Chagas.* Mosby Doyma Argentina. Buenos Aires.
42. **González J., E. Juarez Ramalho-Pinto, U. Frevert, J. Ghiso, S. Tomlinson, Julio Scharfstein, E. J. Corey, V. Nussenzweig.** 1996. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. *J. Exp. Med.* **184**: 1909-1918.
43. **González-Márquez H., C. Perrin, P. Bracquart, C. Guimont, G. Linden.** 1997. A 16 kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiology* **143**: 1587–1594.
44. **Görg A, W. Postel, S. Gunther.** 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**: 531-46.

45. **Graefe S. E. B., M. Wiesgigl, I. Gaworski, A. Macdonald, J. Clos.** 2002. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. *Eukaryot. Cell* **1**: 936-943.
46. **Guex N., M. C. Peitsch.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
47. **Hall B. F.** 1993. *Trypanosoma cruzi*: mechanisms for entry into host cells. *Cell Biol.* **4**: 323-333.
48. **Haslbeck M.** 2002. sHsps and their role in the chaperone network. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1649-1657.
49. **Haslbeck M., T. Franzmann, D. Weinfurtner, J. Buchner.** 2005. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 842-846.
50. **Ho E., H. Chang, S. Kim, H. Kahng, K. Oh.** 2004. Analysis of TNT (2,4,6-Trinitrotoluene)-inducible cellular responses and stress shock proteome in *Stenotrophomonas* sp. OK-5. *Curr. Microbiol.* **49**: 346-352.
51. **Horwitz J.** 2003. Alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.* **76**: 145-153.
52. **Jones D. T.** 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**: 195-202.
53. **Kappé G., A. Aquilina, L. Wunderink, B. Kamps, C. V. Robinson, T. Garate, W. C. Boelens, W. W. de Jong.** 2004. Tsp36, a tapeworm small heat-shock protein with a duplicated α -crystallin domain, forms dimers and tetramers with good chaperone-like activity. *Proteins* **57**: 109-117.
54. **Kim K. K., R. Kim, S. Kim.** 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**: 595-599.
55. **Krauth-Siegel R. L., S. K. Meiering, H. Schmidt.** 2003. The parasite specific trypanothione metabolism of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Biol. Chem.* **384**: 539-549.
56. **Laemmli U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
57. **Lawrence F., M. Robert-Gero.** 1985. Induction of heat shock proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4414-4417.

58. **Lee G. J., A. M. Roseman, H. R. Saibil, E. Vierling.** 1997. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* **16**: 659-671.
59. **Lee M., S. Bae, T. Kim, K. Lee.** 2006. Proteomic analysis of protein expression in *Streptococcus pneumoniae* in response to temperature shift. *J. Microbiol.* **44**: 375-382.
60. **Lee S., H. A. Owen, D. J. Prochaska, S. R. Barnum.** 2000. HSP16.6 is involved in the development of thermotolerance and thylakoid stability in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr. Microbiol.* **40**: 283-287.
61. **Lewin B.** 2000. *Genes VII.* Oxford University Press Inc., New York.
62. **Lindquist S., E. A. Craig.** 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 631-677.
63. **Lund P. A., A. T. Large, G. Kapatai.** 2003. The chaperonins: perspectives from the Archaea. *Biochem. Soc. Trans.* **31** (Pt. 3): 681-685.
64. **Macedo A. M., M. S. Martins, E. Chiari, S. D. Pena.** 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**: 147-153.
65. **Machado C. A., F. J. Ayala.** 2002. Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **121**: 33-47.
66. **MacRae T. H.** 2000. Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 899-913.
67. **Mádi A., S. Mikkat, B. Ringel, M. Ulbrich, H. Thiesen, M. O. G Locker.** 2003. Mass spectrometric proteome analysis for profiling temperature-dependent changes of protein expression in wild-type *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics* **3**: 1526-1534.
68. **Majoul T., E. Bancel, E. Triboï, J. B. Hamida, G. Branlard.** 2004. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *Proteomics* **4**: 505-513.
69. **Marchler-Bauer A., S. H. Bryant.** 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* **32** (W): 327-331.
70. **Maresca B., L. Carratù.** 1992. The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol. Today* **8**: 260-266.

71. **Martin F., J. M. Requena, J. Martin, C. Alonso, M. C. López.** 1993. Cytoplasmic-nuclear translocation of the HSP70 protein during environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**: 1155-1162.
72. **McGuffin L. J., K. Bryson, D. T. Jones.** 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**: 404-405.
73. **Nakamoto H., L. Vigh.** 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 294-306.
74. **Narberhaus F.** 2002. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 64-93.
75. **Nover L., K. D. Scharf.** 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**: 80-103.
76. **Nowicki C., J. J. Cazzulo.** 2007. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. *Comp. Biochem. Physiol.* (en prensa).
77. **Olson C. L., K. C. Nadeau, M. A. Sullivan, A. G. Winkvist, J. E. Donelson, C. T. Walsh, D. M. Engmann.** 1994. Molecular and biochemical comparison of the 70-kDa heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **269**: 3868-3874.
78. **Ovali M., R. D. King.** 2000. Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Prot. Sci.* **9**: 1162-1176.
79. **Paba J., J. M. Santana, A. R. L. Teixeira, W. Fontes, M. V. Sousa, C. A. O. Ricart.** 2004. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics* **4**: 1052-1059.
80. **Pappin D. J., P. Hojrup, A. J. Bleasby.** 1993. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr. Bio.* **3**: 327-332.
81. **Parodi-Talice A., R. Durán, N. Arrambide, V. Prieto, M. D. Piñeyro, O. Pritsch, A. Cayota, C. Cerveñansky, C. Robello.** 2004. Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* **34**: 881-886.
82. **Pérez-Escobar M., A. M. Cevallos, B. Espinoza, N. Espinosa, I. Martínez, R. Hernández.** 2007. *Trypanosoma cruzi* ribosomal protein S4: characterization of its coding locus, analysis of transcripts, and antigenicity of the protein. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**: 473-479.
83. **Perry L. J., R. Wetzel.** 1984. Disulfide bond engineered into T4 lysozyme: stabilization of the protein toward thermal inactivation. *Science* **226**: 555-557.

84. **Petersohn A., M. Brigulla, S. Haas, J. D. Hoheisel, U. Völker, M. Hecker.** 2001. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**: 5617-5631.
85. **Plesofsky-Vig N., J. Vig, R. Brambl.** 1992. Phylogeny of the alpha-crystallin-related heat-shock proteins. *J. Mol. Evol.* **35**: 537-545.
86. **Polla B. S.** 1991. Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Immunol. Today* **12**: A38-A41.
87. **Prohászka Z., G Füst.** 2004. Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life. *Mol. Immunol.* **41**: 29-44.
88. **Reineke A.** 2005. Identification and expression of a small heat shock protein in two lines of the endoparasitic wasp *Venturia canescens*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **141**: 60-69.
89. **Requena J. M., A. Jimenez-Ruiz, M. Soto, R. Assiego, J. F. Santarén, M. C. López, M. E. Patarroyo, C. Alonso.** 1992. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **53**: 201-212.
90. **Requena J. M., M. C. Lopez, A. Jimenez-Ruiz, J. C. de la Torre, C. Alonso.** 1988. A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1393-1406.
91. **Richmond C. S., J. D. Glasner, R. Mau, H. Jin, f. R. Blattner.** 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **27**: 3821-3835.
92. **Rogalla T., M. Ehrnsperger, X. Preville, A. Kotlyarov, G. Lutsch, C. Ducasse, C. Paul, M. Wieske, A. Arrigo, J. Buchner, M. Gaestel.** 1999. Regulation of hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**: 18947-18956.
93. **Sambrook J., E. F. Fritsch, T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
94. **Schmid A. K., M. S. Lipton, H. Motas, M. E. Monroe, R. D. Smith, M. E. Lidstrom.** 2005. Global whole-cell FTICR mass spectrometric proteomics analysis of the heat shock response in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Proteome Res.* **4**: 709-718.
95. **Sies H.** 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**: 213-219.

96. **Slabas A. R., I. Suzuki, N. Murata, W. J. Simon, J. J. Hall.** 2006. Proteomic analysis of the heat shock response in *Synechocystis* PCC6803 and a thermally tolerant knockout strain lacking the histidine kinase 34 gene. *Proteomics* **6**: 845-864.
97. **Sørensen J. G., M. M. Nielsen, M. Kruhøffer, J. Justesen, V. Loeschcke.** 2005. Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones* **10**: 312-328.
98. **Sosa Aguilar Sandro.** 2003. Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
99. **Souto R. P., O. Fernandes, A. M. Macedo, D. A. Campbell, B. Zingales.** 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**: 141-152.
100. **Spano G., L. Beneduce, C. Perrota, S. Massa.** 2005. Cloning and characterization of the *hsp 18.55* gene, a new member of the small heat shock gene family isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. *Res. Microbiol.* **156**: 219-224.
101. **Storino R., M. Jörg.** 1994. Vías de infección y aspectos clínicos. *En*: Storino R. y J. Milei (Ed.), *Enfermedad de Chagas*. Mosby Doyma Argentina. Buenos Aires.
102. **Studer S., M. Obrist, N. Lentze, F. Narberhaus.** 2002. A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial alpha-heat shock proteins. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3578–3586.
103. **Sturm N. R., N. S. Vargas, S. J. Westenberger, B. Zingales, D. A. Campbell.** 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* **33**: 269-279.
104. **Sun Y., T. H. MacRae.** 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 2460-2476.
105. **Tibayrenc M.** 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* **36**: 47-115.
106. **Tibayrenc M., K. Neubauer, C. Barnabé, F. Guerrini, D. Skarecky, F. J. Ayala.** 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1335-1339.

107. **Tibbetts R. S., J. L. Jensen, C. L. Olson, F. D. Wang, D. M. Engman.** 1998. The DnaJ family of protein chaperones in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **91**: 319-326.
108. **van Montfort R. L. M., E. Basha, K. L. Friedrich, C. Slingsby, E. Vierling.** 2001. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 1025-1030.
109. **Vargas-Parada L., C. F. Solís, J. P. Laclette.** 2001. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology* **122**: 583-588.
110. **Waters E. R., G. J. Lee, E. Vierling.** 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**: 325-338.
111. **Wendel S., Z. Brener.** 1992. Historical aspects. *En: Wendel S., Z. Brener, M. E. Camargo, A. Rassi (Ed.), Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine.* ISBT Brazil'92. Sao Paulo.
112. **WHO-World Health Organization.** 2002. Control of Chagas Disease. WHO Technical Report Series **905**: 82-83.
113. **Zilberstein D., M. Shapira.** 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 449-470.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo y antibióticos

Medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

Extracto de levadura	Sigma	5 g
Triptona	Sigma	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma	10 g
Agar (si es sólido)	Sigma	15 g
H ₂ O	Bidestilada	Aforar a 1 L
	pH 7.0	

Medio de infusión de hígado (LIT) (Chiari y Camargo, 1984)

Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma	4 g.
Cloruro de potasio (KCl)	Baker	0.4 g.
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	Baker	8 g.
Glucosa monohidratada (C ₆ H ₁₂ O ₆ -H ₂ O)	Merck	2 g.
Triptosa	Difco	5 g.
Infusión de caldo de hígado	Difco	5 g.
H ₂ O	Bidestilada	Aforar a 1 L
	pH 7.2	

Solución stock de Hemina (Sigma): 5 mg/ml en trietanolamina:agua (1:1)

Una vez esterilizado el medio, complementar con hemina (25 µg/ml) y suero fetal bovino inactivado (56° C por una hora) al 10 %, filtrándolos por una membrana de 0.22 µm. Una vez complementado, proteger el medio de la oscuridad y mantenerlo a 4° C.

Nota: Esterilizar los medios de cultivo a 120° C y 15 libras de presión por 20 minutos.

Antibióticos utilizados en los cultivos de *E. coli*

Antibiótico	Solvente	Concentración usada (µg/ml)
Kanamicina (Km) (Sigma)	H ₂ O	50
Ampicilina (Amp) (Sigma)	H ₂ O	50

Nota: Esterilizar los antibióticos mediante su filtración por una membrana de 0.22 µm antes de adicionarlos al medio de cultivo.

Anexo 2. Soluciones generales

Amortiguador de Fosfato de Sodio (PBS) 10X

Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma	80 g
Cloruro de potasio (KCl)	Baker	2 g
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	Baker	14.4 g
Fosfato de potasio dihidratado (KH ₂ PO ₄)	Baker	2.4 g
H ₂ O	Bidestilada	Aforar a 1 L pH 7.0

Amortiguador de transferencia

Tris base	Sigma	3.03 g
Glicina	Bio-Rad	14.4 g
Metanol	Baker	200 ml
H ₂ O	milli Q	Aforar a 1 L

Mantenerlo en refrigeración antes de su uso.

Anexo 3. Soluciones SDS-PAGE

Acrilamida/Bisacrilamida (30 %/0.8 %)

Acrilamida	Bio-Rad	30 g
N,N-metilen-bisacrilamida	Bio-Rad	0.8 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 100 ml

Filtrar por una membrana de 0.22 µm. Guardar en oscuridad a 4°C.

4X Tris-HCl/SDS pH 6.8

Tris base	Sigma	6.05 g
SDS	Bio-Rad	0.4 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 100 ml pH 6.8

Filtrar por una membrana de 0.22 µm. Guardar en oscuridad a 4°C.

4X Tris-HCl/SDS pH 8.8

Tris base	Sigma	91 g
SDS	Bio-Rad	2 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 500 ml pH 8.8

Filtrar por una membrana de 0.22 µm. Guardar en oscuridad a 4°C.

Persulfato de amonio (APS) al 15%

Persulfato de amonio	Bio-Rad	0.15 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 1 ml
Guardar en oscuridad a 4°C.		

Amortiguador de muestra 4X (Amortiguador de Laemmli)

Tris base	Sigma	3.04 g
Glicerol	Baker	40 ml
SDS	Bio-Rad	4 g
2-mercaptoetanol	Bio-Rad	4 ml
Azul de bromofenol	Bio-Rad	2 mg
H ₂ O	milli Q	Aforar a 100 ml
Guardar en oscuridad a 4°C.		

Amortiguador de electroforesis 5X

Tris base	Sigma	15.1 g
Glicina	Bio-Rad	72 g
SDS	Bio-Rad	5 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 1 L

Solución de agarosa al 0.5%

Agarosa	Gibco	0.5 g
Azul de bromofenol	Bio-Rad	Trazas
Amortiguador de electroforesis 1X		Aforar a 100 ml

Azul de Coomasie

Azul de Coomasie R-250	Bio-Rad	0.25 g
Metanol	Baker	250 ml
Acido acético	Baker	50 ml
H ₂ O	Bidestilada	Aforar a 500 ml
Filtrar con papel filtro de poro mediano. Proteger de la luz.		

Desteñidor de Coomasie

Metanol	Baker	200 ml
Acido acético	Baker	70 ml
H ₂ O	Bidestilada	Aforar a 1 L

Volúmenes requeridos para preparar un gel de poliacrilamida al 10% de 18 x 18 cm, grosor 1.5 mm

Reactivo	Volumen Gel separador (10%)
Acrilamida 30%	20 ml
4X Tris-HCl/SDS pH 8.8	15 ml
Agua milli Q	25 ml
APS 15%	192 µl
TEMED	34.6 µl

Volúmenes requeridos para preparar un gel de poliacrilamida al 15% de 5 x 8 cm, grosor 0.75 mm

Reactivo	Volumen Gel concentrador (4 %)	Volumen Gel separador (15 %)
Acrilamida 30%	0.21 ml	2.5 ml
4X Tris-HCl/SDS pH 8.8	-----	1.25 ml
4X Tris-HCl/SDS pH 6.8	0.417 ml	-----
Agua milli Q	1.017 ml	1.25 ml
APS 15%	8.5 µl	16 µl
TEMED	1.6 µl	3.3 µl

Volúmenes requeridos para preparar un gel de poliacrilamida al 12% de 5 x 8 cm, grosor 0.75 mm

Reactivo	Volumen Gel concentrador (4 %)	Volumen Gel separador (12 %)
Acrilamida 30%	0.21 ml	2 ml
4X Tris-HCl/SDS pH 8.8	-----	1.25 ml
4X Tris-HCl/SDS pH 6.8	0.417 ml	-----
Agua milli Q	1.017 ml	1.75 ml
APS 15%	8.5 µl	16 µl
TEMED	1.6 µl	3.3 µl

Anexo 4. Soluciones Biología molecular

Gel de agarosa al 1.0%

Agarosa	Gibco	1.0 g
Amortiguador TAE 1X		Aforar a 100 ml

Gel de agarosa al 1.5%

Agarosa	Gibco	1.5 g
Amortiguador TAE 1X		Aforar a 100 ml

Amortiguador TAE (Tris-Acetato) 50X

Tris base	Sigma	24.2 g
Ácido acético	Baker	5.71 ml
EDTA pH 8.0 0.5 M	Sigma	10 ml
H ₂ O	milli Q	Aforar a 100 ml

ABREVIATURAS

2D-PAGE	Electroforesis bidimensional (<i><u>2D</u>-poly<u>ac</u>rylamide <u>g</u>el <u>e</u>lectrophoresis</i>)
aa	<u>A</u> mino <u>á</u> cidos
Amp	<u>A</u> mpicilina
APS	Persulfato de amonio (<i><u>A</u>mmonium <u>p</u>ersulfate</i>)
ATP	Adenosin trifosfato (<i><u>A</u>denosine <u>t</u>ri<u>p</u>hosphate</i>)
BSA	Álbumina de suero bovina (<i><u>B</u>ovine <u>s</u>erum <u>a</u>lbumin</i>)
cDNA	Ácido desoxiribonucleico copia (<i><u>c</u>opy <u>d</u>esoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>)
DEPC	<u>D</u> ietil <u>p</u> iro <u>c</u> arbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico (<i><u>D</u>esoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>)
DTT	<u>D</u> itio <u>t</u> reitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético (<i><u>E</u>thylene<u>d</u>iamine <u>t</u>etraacetic <u>a</u>cid</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano (<i><u>H</u>orse<u>r</u>adish <u>p</u>eroxidase</i>)
HSP	Proteína de estrés calórico (<i><u>H</u>eat <u>s</u>hock <u>p</u>rotein</i>)
IEF	<u>I</u> soelectroenfoque
IgG	<u>I</u> mmunoglobulina <u>G</u>
IPG	Gradientes de pH inmovilizados (<i><u>I</u>mmobilized <u>p</u>H <u>g</u>radients</i>)
IPTG	<u>I</u> sopropil- β -D- <u>t</u> iogalactopiranosida
Km	<u>K</u> anamicina
LB	Medio <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LIT	Medio de infusión de hígado (<i><u>L</u>iver <u>i</u>nfusion <u>t</u>ryptose medium</i>)
MALDI-TOF	Ionización desorción con láser asistida con matriz acoplada a un analizador tipo TOF (<i><u>M</u>atriz-<u>a</u>ssisted <u>l</u>aser <u>d</u>esorption/<u>i</u>onisation <u>t</u>ime <u>o</u>f <u>f</u>light</i>)
MDH	<u>M</u> alato <u>d</u> eshidrogenasa
MM	<u>M</u> asa <u>m</u> olecular
MPM	<u>M</u> arcador de <u>p</u> eso <u>m</u> olecular
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero (<i><u>m</u>essenger <u>r</u>ibo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i><u>M</u>ass <u>s</u>pectrometry</i>)
NL	<u>N</u> o <u>l</u> ineal
OD	Densidad óptica (<i><u>O</u>ptical <u>d</u>ensity</i>)
ORF	Marco de lectura abierto (<i><u>O</u>pen <u>R</u>eading <u>F</u>rame</i>)
pb	<u>P</u> ares de <u>b</u> ases

PBS	Amortiguador de fosfato de sodio (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDE	Fosfodiesterasa (<i>Phosphodiesterase</i>)
pI	P unto i soeléctrico
PMF	Huella peptídica (<i>Peptide mass fingerprinting</i>)
PMSF	Fluoruro fenilmetilsulfonil (<i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RT	Transcriptasa reversa (<i>Reverse transcriptase</i>)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (<i>Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction</i>)
SD	Desviación estándar (<i>Standard deviation</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
sHSP	Proteína de estrés calórico de bajo peso molecular (<i>Small Heat shock protein</i>)
TAE	Tris-acetato (<i>Tris acetate</i>)
TEMED	N, N, N', N'- t etrametilen- d iamina
α -HSP	Proteína de estrés calórico de bajo peso molecular con un dominio α -cristalino (<i>α-Heat shock protein</i>)